



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA



ACTIVIDAD BIOCIDA DE VIDRIOS SODOCÁLCICOS QUE CONTIENEN NANOPARTÍCULAS DE PLATA O COBRE

Memoria presentada para optar al grado de

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

LETICIA ESTEBAN TEJEDA

Director:

JOSÉ SERAFÍN MOYA CORRAL

Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Madrid 2012

Dedicada a
Bea

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biomateriales y Materiales Bioinspirados del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM) perteneciente Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección del Dr. José Serafín Moya Corral.

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento al Prof. José Serafín Moya por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y por sus enseñanzas, dedicación, apoyo y consejos.

También me gustaría agradecer a Tony Tomsia y a Eduardo Saiz la gran oportunidad que me dieron admitiéndome en sus respectivos grupos de investigación en Berkeley y en Londres.

A Francisco Malpartida por los buenos momentos que pasé aprendiendo sobre biología, por todo el tiempo que pasó enseñándome y por tu paciencia. Gracias Paco, sin ti no hubiera podido hacer esta tesis.

A Roberto López porque ha demostrado que siempre se puede contar con él y gracias a quien la etapa final de esta tesis ha podido realizarse. A Sonia Mello y Antonio Carlos, siempre dispuestos a colaborar y a aprender algo nuevo. A Carlos Pecharromán por estar siempre dispuesto a ayudarme y por los valiosos conocimientos que me has aportado.

A Cristina Patiño por estar siempre disponible para ofrecer su ayuda y

por enseñarme a preparar y a mirar las muestras al microscopio. También quisiera agradecer a Javier Bueno, Fernando Pinto y Andrés Valera por las horas de microscopio que pasamos juntos y a José Berjano por ofrecer siempre su ayuda.

A Ramón Torrecillas y en especial a Toño por su gran ayuda. A Luis Alou, Fabio Cafini y David Sevillano por los estudios de biofilm.

No quiero olvidarme de todos aquellos con los que alguna vez hemos colaborado, permitiéndonos realizar experimentos en sus laboratorios.

A mis compañeros de materiales, Alejo, Antón, Bernd, Chus, Daniel, Gustavo, José Bartolomé, Laura, Lola, Mariana, Nacho, Nines, Óscar, Rocío, Simo por hacerme reír y olvidarme de los problemas.

A mis compañeros de despacho, especialmente Lydya, César por las risas, los buenos ratos, los téis, y por apoyarme en los momentos difíciles. A Iván por enseñarme los límites y extralímites del uso del L^AT_EX, por la paciencia y por ayudarme a no desesperar con la tesis.

A mis compañeros de café del cnb, que luego se convirtieron en mis compañeros de comida Aleyo, Jacobo, Lucio y María, por vuestros ánimos, por los buenos momentos compartidos y porque finalmente os habéis convertido en mis amigos. A Trini por sus tartas, sus risas y por enseñarme a plaquear, sembrar y demás. A Elena, Cristina, Domingo, Álvaro y Sofía que siempre me alegrabais el día. Y a la Otra Leti por los momentos inverosímiles donde lo más simple acababa complicándose. A mis amigos, especialmente Bea, el Panda, Teresa, Andrea, Dani y Patricia que me habéis apoyado y siempre estáis, pase lo que pase. A Ismael, por ser un gran amigo por todos los buenos momentos que hemos vivido y por haberme apoyado y animado en todo momento.

A mi familia por apoyarme y estar siempre pacientes durante estos cuatro años.

Índice general

Agradecimientos	III
1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Perspectiva histórica	2
1.3. Implantes médicos	4
1.3.1. Biomateriales metálicos: el titanio y sus aleaciones .	6
1.3.2. Biomateriales cerámicos	9
1.3.3. Infecciones y pérdida del implante	11
1.4. Biocidas inorgánicos y nanotecnología	12
1.4.1. Nanotecnología	14
1.4.2. Aplicaciones biocidas de las nanopartículas de plata y cobre	18
1.5. Principales problemas de las nanopartículas	21
1.5.1. Toxicidad	22
1.5.2. Aglomeración	24
1.6. El vidrio como matriz	25
1.7. Fuentes de nanopartículas de Ag y Cu	29
1.8. Objetivos	30
1.9. Bibliografía	31
2. Técnicas y métodos experimentales	49
2.1. Análisis químico	49

2.2. Determinación del tamaño de partícula de los materiales en polvo	50
2.3. Análisis térmico diferencial (ATD) y termogravimétrico (TG)	50
2.4. Difracción de Rayos X	51
2.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	51
2.6. Espectroscopia UV-visible	52
2.7. Espectroscopia infrarroja (IR)	52
2.8. Microscopía de calefacción	52
2.9. Dilatometría	53
2.10. Indentación Vickers	53
2.11. Perfilometría	55
2.12. Tratamiento térmico	55
2.13. Molienda	56
2.14. Prensado	56
2.14.1. Prensado uniaxial	56
2.14.2. Prensado isostático en frío	56
2.15. Pulido	57
2.16. Caracterización microestructural	57
2.16.1. Microscopía óptica de luz reflejada	57
2.16.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	58
2.16.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	58
2.17. Estudios de resistencia hidrolítica	61
2.18. Ensayos biocidas	61
2.18.1. Preparación de los microorganismos	62
2.18.2. Cultivo en medio líquido	62
2.18.3. Antibiógramas	64
2.18.4. Estudios de biopelícula o <i>biofilm</i>	66
2.19. Medidas de pH	68
2.20. Estudios de despolarización de membrana	68
2.21. Estudios de lixiviación	69
2.21.1. Lixiviación de cobre, plata y calcio de los polvos de vidrio durante los ensayos de cultivo en medio líquido	69
2.21.2. Lixiviación de cobre, plata y calcio de los recubrimientos durante los ensayos de antibiógramas	69

2.21.3. Lixiviación de plata en agua desionizada de los polvos de vidrio-nAg empleados en los recubrimientos . . .	70
2.22. Bibliografía	72
3. Actividad biocida de materiales inorgánicos que contienen nAg	75
3.1. Materiales de partida	76
3.1.1. Diatomeas	76
3.1.2. Caolín	77
3.1.3. Metacaolín	79
3.1.4. Montmorillonita	80
3.1.5. Sepiolita	82
3.1.6. Hidroxiapatito	83
3.2. Obtención de nanopartículas de plata soportadas y/o embebidas en matrices inorgánicas	85
3.3. Estudio de la actividad biocida	85
3.4. Bibliografía	89
4. Actividad biocida de un vidrio sodocálcico en polvo que contiene nAg o nCu	95
4.1. Caracterización de los materiales de partida	96
4.1.1. Análisis químico	99
4.1.2. Distribución del tamaño de partícula	100
4.1.3. Difracción de Rayos X	101
4.1.4. Espectroscopia UV-visible	102
4.1.5. Análisis térmico diferencial (ATD) y termogravimétrico (TG)	106
4.1.6. Caracterización microestructural	107
4.2. Obtención de nanopartículas de plata y cobre embebidas en la matriz vítrea	110
4.3. Caracterización de los polvos de vidrio obtenidos	115
4.3.1. Análisis químico	115
4.3.2. Difracción de Rayos X	117
4.3.3. Espectroscopia UV-visible	118

4.3.4.	Caracterización microestructural	120
4.3.4.1.	Microscopía electrónica de barrido	121
4.3.4.2.	Microscopía electrónica de transmisión	122
4.3.5.	Resonancia magnética nuclear	127
4.4.	Actividad biocida de las nanopartículas de plata dispersas en una matriz vítrea	128
4.4.1.	Estudio de la toxicidad y del mecanismo de acción biocida de los polvos de vidrio-nAg obtenidos	132
4.5.	Actividad biocida de nanopartículas de cobre dispersas en una matriz vítrea o incorporadas a la red vítrea	139
4.5.1.	Estudio de la toxicidad y del mecanismo de acción biocida de los polvos de vidrio-nCu y vidrio-Cu _{incorporado} obtenidos	141
4.6.	Bibliografía	147
5.	Recubrimientos biocidas sobre materiales cerámicos oxídicos	153
5.1.	Obtención de recubrimientos biocidas sobre materiales cerámicos oxídicos	154
5.2.	Caracterización de los recubrimientos	156
5.2.1.	Análisis químico	156
5.2.2.	Difracción de Rayos X y Espectroscopía UV-visible	156
5.2.3.	Caracterización microestructural	158
5.2.3.1.	Microscopía óptica	159
5.2.3.2.	Microscopía electrónica de barrido	162
5.2.3.3.	Microscopía electrónica de transmisión	166
5.2.3.4.	Caracterización mecánica de los recubrimientos	168
5.3.	Actividad biocida de los recubrimientos sobre materiales cerámicos oxídicos	169
5.4.	Bibliografía	174

6. Recubrimientos biocidas sobre la aleación Ti-6Al-4V	175
6.1. Obtención de recubrimientos biocidas sobre la aleación Ti-6Al-4V	175
6.2. Caracterización de los recubrimientos sobre placas de la aleación Ti-6Al-4V	178
6.2.1. Análisis químico	178
6.2.2. Difracción de Rayos X, espectroscopía UV-visible y estabilidad mecánica	178
6.2.3. Estudio de mojabilidad y adherencia al sustrato . .	180
6.2.4. Caracterización microestructural	185
6.2.4.1. Microscopía electrónica de barrido	185
6.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión . .	187
6.3. Actividad biocida de los recubrimientos sobre placas de Ti-6Al-4V	188
6.3.1. Antibiógramas	188
6.3.2. Cultivo en medio líquido	189
6.3.3. Estudios de <i>biofilm</i>	190
6.4. Recubrimientos biocidas sobre pilares de cicatrización de la aleación Ti-6Al-4V	197
6.4.1. Caracterización de los recubrimientos sobre pilares de cicatrización de la aleación de Ti-6Al-4V	200
6.4.2. Actividad biocida de los recubrimientos sobre pilares de cicatrización de Ti-6Al-4V	201
6.5. Bibliografía	204
7. Conclusiones	207
Publicaciones derivadas de la tesis	211
A. Actividad biocida de vidrios con alto contenido en calcio	213
A.1. Caracterización de polvos de vidrio con alto contenido en calcio	214
A.2. Actividad biocida de vidrios con alto contenido en calcio . .	217
A.3. Bibliografía	223

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación

Actualmente ha surgido la necesidad de desarrollar a nivel global nuevos biocidas que sean estables frente a los agentes medioambientales, de baja toxicidad y con una elevada actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos (bacterias, levaduras, hongos...). Las nanopartículas de cobre, y sobre todo las de plata, han sido propuestas en la literatura como base de posibles biocidas inorgánicos. En consecuencia, la principal motivación de esta tesis es el desarrollo de nuevos biocidas inorgánicos nanoestructurados, estables químicamente, de amplio espectro y libres de toxicidad.

Uno de los retos que se plantean en este trabajo de investigación consiste en obtener biocidas inorgánicos que contengan nanopartículas metálicas y que sean, además, dosificadores de estas nanopartículas. Con ello se podrá conseguir prolongar su actividad a lo largo del tiempo y limitar la toxicidad inherente a las nanopartículas, lo que les convierte en materiales biocidas idóneos para utilizarse en un amplio rango de aplicaciones, ya sea como material en polvo o como recubrimientos.

Otro de los retos planteados es evitar los problemas de salud derivados de la manipulación de las nanopartículas, así como su aglomeración y oxidación durante el procesado. Esto se consigue embebiendo las nanopartículas en una matriz vítrea.

Finalmente, se pretende que estos compuestos biocidas puedan obtenerse mediante una ruta sencilla, reproducible, de bajo coste y fácilmente escalable a nivel industrial.

1.2. Perspectiva histórica

Los microorganismos causan una gran cantidad de enfermedades así como la contaminación del agua potable o la degradación de las frutas y vegetales.^{1,2} En la actualidad están desarrollando resistencia frente a múltiples antibióticos por lo que existe una clara necesidad de buscar y formular nuevos agentes biocidas de bajo coste para su producción industrial.³ Los compuestos antimicrobianos de carácter inorgánico tienen un especial interés frente a los de carácter orgánico debido a que son más estables químicamente, tienen una mayor resistencia frente al calor y una larga vida.^{4,5} Además, algunos de estos microorganismos forman biopelículas o *biofilm*. Una biopelícula es una comunidad compleja, compuesta por uno o varios tipos de microorganismos que crecen adheridos a una superficie o sustrato y se caracterizan por segregar polisacáridos, los cuales constituyen una matriz protectora que permite la formación de estructuras tridimensionales organizadas.^{6,7} El proceso de formación y crecimiento de las biopelículas está compuesto por tres fases fundamentales: adhesión, colonización o crecimiento y dispersión, según se esquematiza en la figura 1.1.

La formación y crecimiento de las biopelículas afecta a un amplio rango de materiales y aplicaciones tales como: implantes médicos, equipos quirúrgicos, ropa protectora en hospitales, equipamiento industrial y

marino, plataformas petrolíferas, envases y almacenes de comida, tratamiento de agua o espacios públicos.^{8,9} Por este motivo, el problema de la formación de biopelículas o biocontaminación ha generado en la última década varias líneas de investigación dirigidas a la síntesis de recubrimientos, basados principalmente en siliconas y fluopolímeros. Sin embargo, estos recubrimientos tienen serias desventajas como son su elevado precio, su difícil aplicación y su toxicidad.¹⁰ En la actualidad, aunque se usan como recubrimientos biocidas en todo el mundo más de 18 agentes químicos, solo 9 de ellos están aprobados por la Ejecutiva de Salud y Seguridad del Reino Unido (Health and Safety Executive “HSE”).^{11–14} En el caso particular de la aplicación sobre implantes médicos, campo en continuo desarrollo y crecimiento, es un requisito imprescindible que, además, el recubrimiento sea biocompatible y libre de efectos adversos sobre la salud.

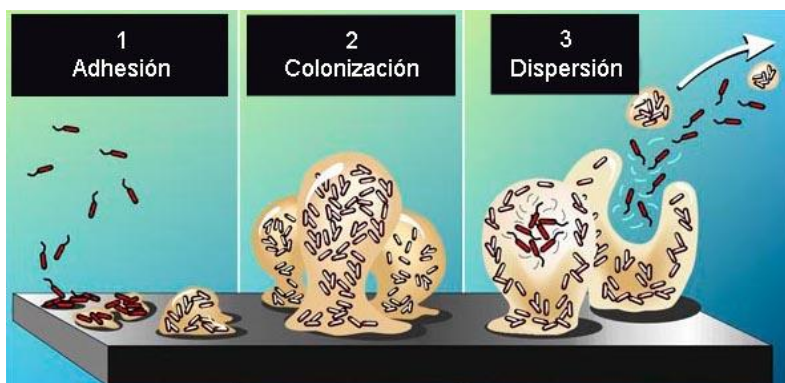


Figura 1.1: Representación esquemática de las etapas que constituyen el proceso de formación y crecimiento de biopelículas.

1.3. Implantes médicos

Este campo está adquiriendo una enorme importancia debido a que, a consecuencia del envejecimiento de la población, la inserción de implantes es cada vez más frecuente en las sociedades industrializadas. En Estados Unidos alrededor de 25 millones de personas tienen al menos un implante¹⁵ y cada año se ponen aproximadamente 1 millón de caderas y de rodillas artificiales¹⁶ y más de 700.000 implantes dentales.¹⁷



Figura 1.2: Implantes médicos más frecuentes.

En todo el mundo el número de implantes dentales insertados cada año supera los 1,3 millones y existen aproximadamente 80 proveedores diferentes que producen 220 marcas de implantes diferentes¹⁸. El campo de los biomateriales se ha convertido en un área de vital importancia, utilizándose en diferentes partes del cuerpo humano como en válvulas artificiales para el corazón, cánulas en vasos sanguíneos, implantes de

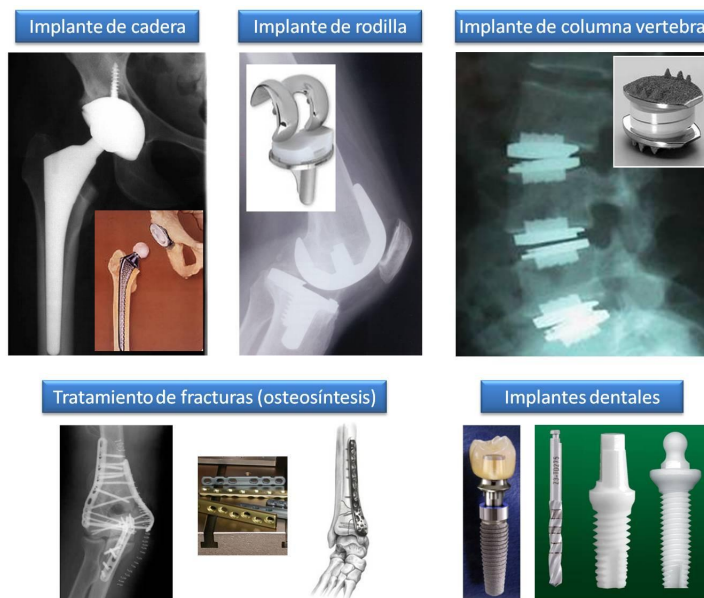


Figura 1.3: Implantes médicos más frecuentes.

hombros, rodillas, caderas, codos, orejas o estructuras ortodentales, de manera que pueden mejorar la calidad de vida e incluso alargarla.^{19–22} En las figuras 1.2 y 1.3 se muestran los implantes más comunes.

Los biomateriales más usados pueden ser clasificados según su naturaleza en:

- Materiales metálicos** destacando las aleaciones de Co-Cr, las aleaciones de titanio y el titanio puro.

- Materiales sintéticos** como el hidroxiapatito.

- Materiales cerámicos** como alúmina y zircona.

-**Materiales poliméricos** entre los que destacan el polietileno de ultra alto peso molecular conocido como “UHMWPE” y el polimetilmetacrilato cuyas siglas son “PMMA”.

En la tabla 1.1 se resumen las propiedades y aplicaciones más importantes de estos biomateriales.

Material	Aplicaciones	Propiedades
Aleación Co-Cr	Vástago, bola y copa de las prótesis de cadera.	Rígido, duro y resistente al desgaste.
Aleación Ti	Vástago, soporte para el UHMWPE e implantes dentales.	Baja rigidez.
Ti puro	Implantes dentales.	Excelente oseointegración.
Hidroxiapatito	Recubrimiento.	Rápida oseointegración, degradación a largo plazo.
Alúmina	Bola y copa.	Dura, frágil, elevada resistencia al desgaste.
Circona	Bola.	Alta tenacidad, elevada resistencia al desgaste.
UHMWPE	Copa y plata de la tibia en prótesis de rodilla.	Frágil, baja resistencia a la tracción y a la fatiga.
PMMA	Fijación con cemento óseo.	Frágil, baja resistencia a la tracción y a la fatiga.

Tabla 1.1: Propiedades y aplicaciones de los biomateriales más comunes²³

1.3.1. Biomateriales metálicos: el titanio y sus aleaciones

Un buen biomaterial además de ser compatible mecánica y biológicamente, debe tener una buena oseointegración y mejorar su resistencia frente al desgaste y a la corrosión en un medio biológico.²⁴ Por este motivo, actualmente se utilizan implantes metálicos de acero inoxidable 316L (316LSS), las aleaciones de cobalto-cromo y el titanio y sus aleaciones. Sin embargo, de los implantes de acero inoxidable y de las

aleaciones de Co-Cr se liberan níquel, cobalto y cromo que son tóxicos y/o carcinogénicos para el organismo y producen enfermedades en la piel como dermatitis. Como consecuencia, los implantes de titanio y sus aleaciones han adquirido un papel relevante.²⁵⁻²⁷ Además, las aleaciones de titanio son materiales muy versátiles porque tienen buenas propiedades mecánicas, excelente resistencia a la corrosión y presentan una amplia gama de microestructuras dependiendo del procesamiento químico y termomecánico.

El titanio que se utiliza en implantes quirúrgicos se presenta en cuatro grados diferentes según las normas ASTM e ISO. La principal diferencia entre ellos estriba en el contenido de gases en solución (N, H, O) debido a la gran reactividad del titanio con estos gases, pero también se diferencian en los contenidos de carbono intersticial y de hierro residual en solución sólida.

A su vez, el titanio existe en dos formas alotrópicas: a baja temperatura presenta una estructura hexagonal compacta conocida como fase α mientras que a partir de $\sim 882^\circ\text{C}$ presenta una estructura cúbica centrada en el cuerpo denominada fase β . La temperatura de transformación de fase α a β puede incrementarse o disminuirse en función de la naturaleza de los elementos aleantes. Aquellos elementos como el Al, O, N, etc. que tienden a estabilizar la fase α e incrementan la temperatura de transición a la fase β se llaman α estabilizadores. Asimismo, los elementos como el V, Mo, Nb, Fe que estabilizan la fase β se denominan β estabilizadores. La clasificación más aceptada de las aleaciones de titanio se basa en la cantidad de estas dos formas alotrópicas: las aleaciones que contienen únicamente α estabilizadores y, por tanto, están compuestas por la fase α , se conocen como aleaciones α ; las aleaciones que contienen 1-2% de β estabilizadores y un 5-10% de fase β se denominan aleaciones casi α ; las que contienen entre 10-30% de fase β se denominan aleaciones $\alpha + \beta$. Finalmente, las aleaciones con mayores contenidos de estabilizadores de fase β , que se obtienen mediante un enfriamiento rápido se llaman aleaciones β metaestables. Dependiendo de la composición química de la

aleación, de la temperatura del tratamiento térmico y de la velocidad de enfriamiento se pueden cambiar la fracción volumétrica de la fase α y la naturaleza de la fase β . Si el enfriamiento es rápido, la fase β obtenida puede estar constituida por martensita o por láminas de fase α contenidas en la fase β , mientras que si el enfriamiento es lento se obtiene únicamente fase β . En las aleaciones β metaestables, la fase β generalmente se obtiene mediante un enfriamiento muy rápido o templado desde el campo β . A menores temperaturas se forman precipitados muy finos de fase α , lo que confiere a estas aleaciones una resistencia muy elevada. Los detalles de la transformación de fase, así como las complejas relaciones entre procesamiento-microestructura-propiedades están descritas en varios artículos y libros.^{28–33}



Figura 1.4: Microestructura de la aleación Ti-6Al-4V.³⁵

La aleación Ti-6Al-4V es del tipo $\alpha + \beta$ cuya microestructura se muestra en la figura 1.4, y es la aleación biomédica más usada debido al excelente balance entre sus buenas propiedades mecánicas, su resistencia frente a la corrosión, su buen comportamiento a temperaturas elevadas y su capacidad tanto para ser trabajada mecánicamente como para modificar sus propiedades mediante diferentes tratamientos térmicos. Dentro de sus buenas propiedades mecánicas destacan su mayor resistencia mecánica,

mayor ductilidad, mayor resistencia a la fatiga cíclica, mayor resistencia a la tracción y además presenta un módulo de Young alrededor de los 110GPa, lo que significa que es elásticamente compatible con el hueso.^{24,34} En la tabla 1.2 se resumen las propiedades mecánicas a tracción de la aleación Ti-6Al-4V en función de la microestructura.

Microestructura	Límite elástico (MPa)	Resistencia a tracción (MPa)	Elongación (%)	Estricción (%)
Mill-annealed	880	945	18	34
Widmanstatten	750	885	15	18
Martensita	840	1070	7	14

Tabla 1.2: Propiedades mecánicas a tracción de la aleación Ti-6Al-4V.³⁶

1.3.2. Biomateriales cerámicos

Los biomateriales cerámicos más usados son la alúmina y la zircona. Ambos se suelen emplear en la fabricación de implantes dentales y de cadera.^{18,37,38} También se utilizan en la fabricación de tornillos para la fijación de prótesis al hueso y en el tratamiento de fracturas. Estos biomateriales cerámicos presentan ciertas ventajas tales como una mayor resistencia mecánica, mejores propiedades tribológicas, mayor estabilidad química y además son susceptibles de ser recubiertos por materiales vitrocristalinos a elevadas temperaturas ($>1000^{\circ}\text{C}$) sin afectar a sus propiedades mecánicas ni microestructurales.

En la figura 1.5 (izda.) aparece una imagen de una prótesis de cadera de alúmina reforzada con zircona comercializada por CeramTec con el nombre de BioloX. En la parte derecha se muestra la microestructura correspondiente a dicha prótesis.

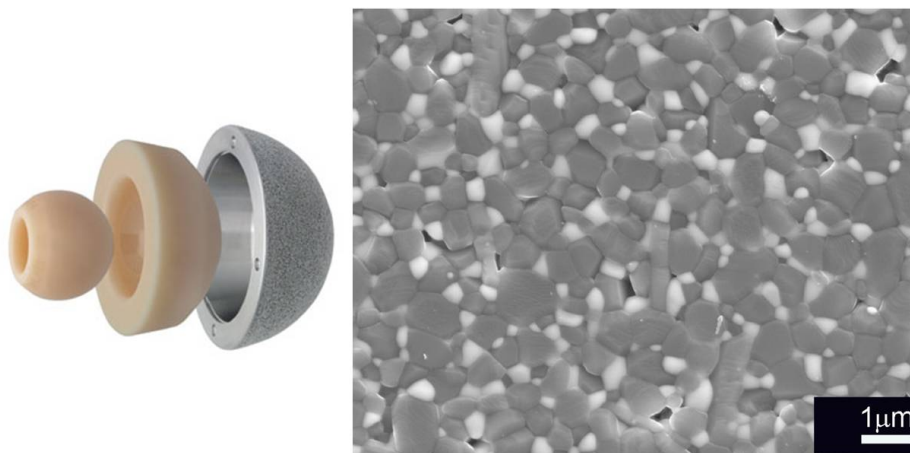


Figura 1.5: Prótesis de cadera (izda.) y microestructura (dcha.) de alúmina de CeramTec.

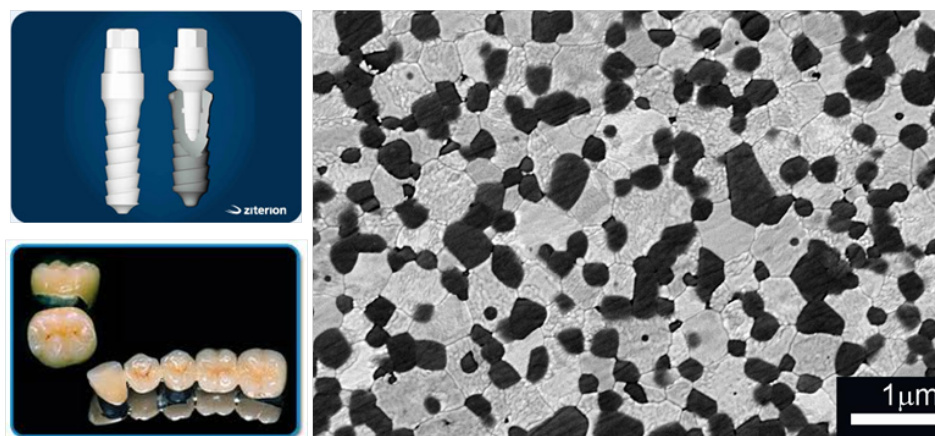


Figura 1.6: Implantes dentales (izda.) y microestructura (dcha.) de circona parcialmente estabilizada con ceria comercializados por Nanoker S.L.

Asimismo, en la figura 1.6 se muestra un ejemplo de implantes y coronas dentales de un material nanoestructurado de circona parcialmente estabilizada con ceria (comercializada por Nanoker S.L.) junto con su microestructura.

1.3.3. Infecciones y pérdida del implante

Los implantes médicos tienen una elevada predisposición a causar infecciones tras la cirugía y constituyen una causa importante de diversas patologías, debido a que sobre ellos se forman y crecen biopelículas, ocasionando el gasto de billones de dólares anuales en el tratamiento de enfermedades infecciosas.^{39–41} A menudo, la pérdida del implante es inevitable, a pesar de que se suelen suministrar antibióticos como imipenem o tobramicina.^{42,43} La colocación de un cemento impregnado con antibióticos es una opción frecuentemente empleada en el tratamiento de infecciones crónicas de los implantes o prótesis, sobre todo de cadera. Sin embargo, existe una gran controversia respecto a esta técnica, y deben evaluarse individualmente los riesgos frente a los beneficios para cada grupo de pacientes, por ejemplo el elevado coste, el elevado riesgo de que los microorganismos desarrollen resistencia frente al antibiótico y el posible fallo mecánico a largo plazo.^{44–51}



Figura 1.7: Imagen de la infección bacteriana (periimplantitis) alrededor del implante insertado.

En el campo de los implantes dentales, en más del 10% se genera periimplantitis, una infección que constituye el riesgo más importante de pérdida de hueso y que provoca una pobre osteointegración, lo que se traduce finalmente en la pérdida del implante (figura 1.7).^{18,52} Todo esto genera la perentoria necesidad de buscar nuevos recubrimientos biocidas de carácter inorgánico que sean eficaces y estén libres de toxicidad para prevenir el asentamiento y crecimiento de colonias de microorganismos¹⁰.

1.4. Biocidas inorgánicos y nanotecnología

La necesidad de desarrollar nuevos agentes biocidas de carácter inorgánico ha centrado la atención sobre la plata y el cobre. La actividad antimicrobiana de las sales de plata y de cobre se conoce desde la antigüedad. Ya en la antigua Grecia y Roma se conocían los efectos bactericidas de la plata y se empleaba para prevenir enfermedades. Las copas de plata se utilizaban para conservar el agua y el vino (figura 1.8), y porque se creía que las enfermedades no se transmitían si se bebía de una copa de plata. También se añadían monedas de plata a los recipientes que contenían leche para evitar su deterioro. Hipócrates, el padre de la medicina, aseguraba que la plata cicatriza las heridas y controlaba las enfermedades.⁵³



Figura 1.8: Copas de plata pertenecientes a las antiguas Grecia (dcha.) y Roma (izda.).

Asimismo, la plata ha sido empleada durante siglos en el tratamiento de infecciones y se usa habitualmente en infecciones de catéteres, quemaduras, osteomielitis crónica severa, infecciones del tracto urinario o en aplicaciones dentales.^{3,54–57} Los compuestos de plata se convirtieron en la mejor arma contra las infecciones durante la Primera Guerra Mundial hasta la llegada de los antibióticos. Entre 1900 y 1940, decenas de miles de pacientes consumieron plata coloidal, y varios millones de dosis intravenosas fueron inyectadas. Sin embargo, la plata inyectada vía intravenosa causa convulsiones e, incluso, la muerte; y la administración vía oral de dosis elevadas puede causar problemas gastrointestinales⁵⁸. Existen numerosos estudios según los cuales la plata también afecta al sistema nervioso central, acumulándose en las neuronas, ganglios y en la médula espinal.^{59,63} También produce efectos adversos sobre el sistema respiratorio y causa argiria (pigmentación irreversible de la piel) y argirosis (pigmentación de los ojos).⁶⁴



Figura 1.9: Fotografía de un hombre afectado de argiria.

En la figura 1.9 se ilustra un ejemplo de los efectos de la plata, la argiria producida en un hombre llamado Paul Karason que tomó durante muchos años plata coloidal como antibiótico natural.

Por otra parte, el cobre es un conservante muy efectivo y ampliamente

conocido que se aplica habitualmente en el tratamiento de la madera y de los tejidos.⁶⁵ También se utiliza para eliminar el crecimiento de algas en piscinas, baños de agua, tanques y otras aplicaciones acuáticas.⁶⁶ Los investigadores recomiendan el uso de la plata y del cobre como desinfectantes en el tratamiento de aguas residuales que contengan microorganismos generadas en hospitales.^{67,68}

El surgimiento de la nanotecnología en la última década proporciona la oportunidad de investigar el efecto biocida de las nanopartículas de plata y de cobre. Las nanopartículas tienen un tamaño muy reducido ($<100\text{nm}$), lo que les confiere una elevada superficie específica y, además, permite una interacción directa con las membranas celulares de los microorganismos.^{69,70} En este sentido, se han llevado a cabo investigaciones dirigidas al desarrollo de materiales nanoestructurados para mejorar la biocompatibilidad de la plata y del cobre y reducir las dosis empleadas y, con ello, los efectos adversos.^{4,71–75} Existen varios estudios donde se pone de manifiesto que las nanopartículas de plata y de cobre interaccionan con virus, bacterias y con el sistema inmunológico, y su eficacia depende significativamente del tamaño y forma de las nanopartículas, así como de la composición de los materiales nanoestructurados.⁷⁶

1.4.1. Nanotecnología

La nanotecnología trata la materia en la escala de 0,1 a 100nm y se puede definir como el diseño, fabricación y aplicación de nanomateriales o materiales nanoestructurados, así como el conocimiento de las propiedades físicas y las dimensiones del material.

En la actualidad, las nanopartículas tienen un gran interés debido a las propiedades inusuales y específicas que presentan como consecuencia de su pequeño tamaño. Su uso está revolucionando la tecnología por la gran variedad de sus posibles aplicaciones en campos tan diversos como

biomedicina, óptica, magnetismo o catálisis.^{77–84} Como resultado, la nanotecnología es una ciencia en auge, según se desprende de las figuras 1.10, 1.11 y 1.12. Un ejemplo de ello es que el número de patentes relacionadas con la nanotecnología concedidas en Estados Unidos ha aumentado considerablemente en los últimos años (figura 1.10).⁸⁵

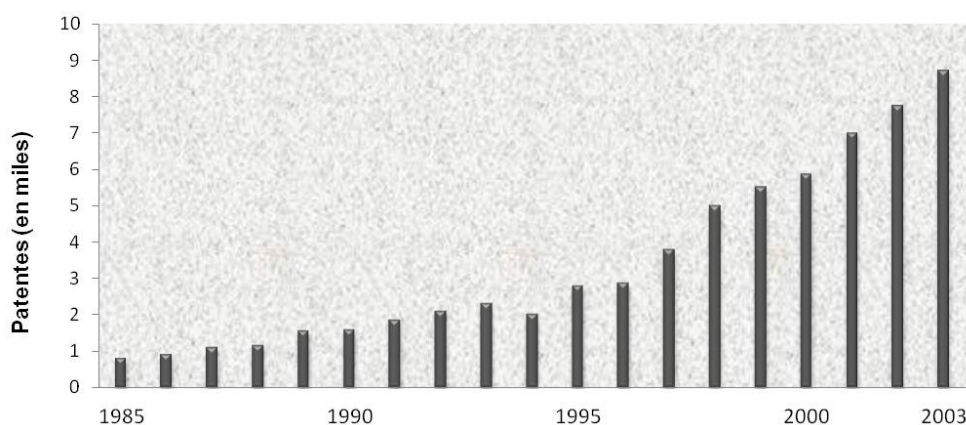


Figura 1.10: Patentes concedidas en Estados Unidos relacionadas con la nanotecnología (en miles). Fuente: Huang et al.⁸⁶

En este sentido, la producción de nanopartículas se ha incrementado últimamente y se prevé que continúe creciendo. Esto se debe a que cada vez son más los productos comerciales basados en la nanotecnología, como puede observarse en la figura 1.11 y en la figura 1.12 donde aparecen desglosados por categorías los 1393 productos comerciales manufacturados en el año 2011 que utilizaron la nanotecnología frente a los fabricados en 2006.

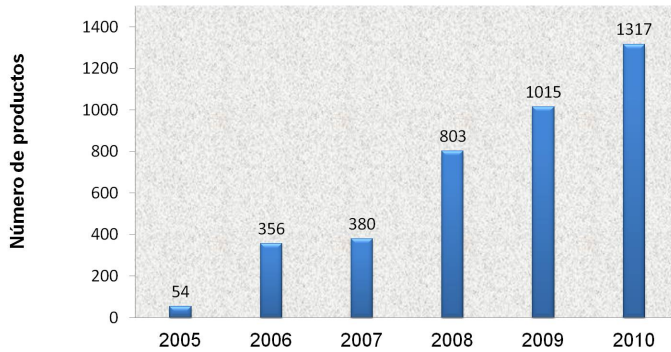


Figura 1.11: Productos comerciales que usaron la nanotecnología desde el año 2005 hasta el 2010.⁸⁷

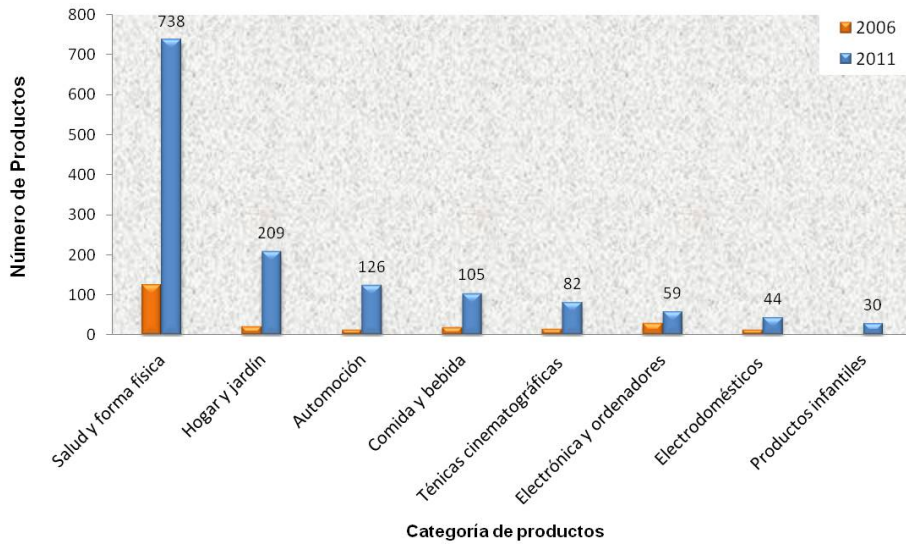


Figura 1.12: Productos comerciales desglosados por categorías que usan la nanotecnología en 2006 y 2011.⁸⁷

Sin embargo, las nanopartículas han sido empleadas desde la antigüedad. Es el caso de obras de arte pertenecientes al Imperio Romano, la Edad Media o al Renacimiento donde las nanopartículas eran utilizadas como pigmentos por los colores intensos y bien definidos que producían.^{88–91} Por ejemplo, el conocido pigmento azul Maya estaba constituido por nanopartículas. También la famosa copa de Lycurgus, obra perteneciente al Imperio Romano (siglo IV d.C.), contiene nanopartículas embebidas en el vidrio, al igual que las vidrieras de la Edad Media, con el fin de obtener diferentes colores mediante la absorción de la luz.⁹² Otro ejemplo de la aplicación de las nanopartículas es el lustre, técnica de coloración aplicada por los ceramistas islámicos cuyo uso se extendió en el siglo IX. Se cree que la técnica se inventó en Egipto, para usarse sobre vidrio, aproximadamente en el 700-800 d.C., y fue llevada por los trabajadores artesanos a Mesopotamia. La técnica implica la preparación de una mezcla especial que contiene arcilla, compuestos de cobre o plata y sulfatos para reducir los iones correspondientes de cobre o plata. La mezcla se pinta sobre el vidriado cocido y la vasija se cuece por tercera vez en una atmósfera reductora a baja temperatura. El óxido metálico, reducido a metal, queda suspendido en el vidriado que aparece en esta etapa como una película de entre 100nm y 1 μ m de espesor. Esta película está compuesta por las nanopartículas metálicas embebidas en la matriz vítrea, cuyo tamaño varía desde 5 hasta 50nm y producen un brillo característico.^{93–99}

Actualmente, los nanomateriales se suelen clasificar en función del número de dimensiones pertenecientes al rango nanométrico:

-Nanomateriales 1D. Son aquellos materiales que tienen una dimensión en la escala nanométrica. Dentro de este grupo destacan las películas delgadas o revestimientos de superficies, incluyendo los circuitos integrados.

-Nanomateriales 2D. Están compuestos por materiales que poseen dos dimensiones en la escala nanométrica como los nanohilos y nanotubos.

-Nanomateriales 3D. Las tres dimensiones de estos materiales están dentro del rango nanométrico como nanopartículas libres o coloides de diferentes morfologías.

Esta tesis se centra en el uso del tercer tipo de nanomateriales, denominados nanopartículas. Para su síntesis existen diferentes métodos, entre los que se distinguen los métodos llamados *top-down* y los denominados *bottom-up*. El método *top-down* más utilizado es la activación mecánica, consistente en la mezcla de los componentes y una posterior molienda muy energética.¹⁰⁰ Con este método se puede obtener una gran cantidad de nanopartículas, pero con un elevado nivel de aglomeración y de concentración de impurezas. Dentro de los métodos *bottom-up* cabe destacar los procesos de vía húmeda que parten de suspensiones coloidales y obtienen las nanopartículas por descomposición térmica o hidrotermal del precursor.¹⁰¹ El principal problema que presentan es la aglomeración de las nanopartículas. Para evitarlo se pueden emplear matrices o surfactantes. Los surfactantes son compuestos que tienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. La parte hidrofílica o polar contiene átomos de O, S, N o P formando parte de grupos funcionales del tipo alcohol, tiol, éter, éster, ácido, amina, amida... que tienen afinidad por los disolventes polares. La parte apolar está compuesta por hidrocarburos parafínicos, cicloparafínicos o aromáticos, que presentan afinidad por los solventes apolares como hidrocarburos, aceites o grasas, o simplemente son repelidos por el solvente polar, generalmente el agua. El principal inconveniente de este método es su bajo rendimiento, lo cual encarece notablemente el proceso.

1.4.2. Aplicaciones biocidas de las nanopartículas de plata y cobre

La interacción de las nanopartículas de plata y cobre con los virus es un campo bastante inexplorado aún. Los virus están rodeados de una envoltura proteica llamada cápsida. Algunos virus, además tienen otra

envoltura externa compuesta por proteínas y lípidos. Las proteínas de la cápsida permiten al virus adherirse a la célula huésped resultando en una fusión de las membranas viral y celular, permitiendo la infección. Por este motivo hay un gran interés en estudiar los posibles mecanismos de adherencia de los virus.⁷⁶ Recientemente, se ha sugerido que las nanopartículas se unen a los enlaces disulfuro de la envoltura glicoproteica de los virus inhibiendo la fusión.¹⁰² También hay otros estudios que analizan la interacción de las nanopartículas de plata con virus como el VIH-1 o el virus de la hepatitis B.^{102,103} Sin embargo, se necesitan estudios *in vivo* con el fin de diseñar tratamientos terapéuticos y vacunas para que puedan atacar específicamente a los virus, y de esta manera incrementar la eficacia y disminuir los efectos adversos.⁷⁶

Por otra parte, existen estudios que revelan que las nanopartículas de plata causan daños en las membranas bacterianas, afectando a procesos bioquímicos de las células, por ejemplo la respiración, produciendo finalmente la muerte celular.¹⁰⁴ Según dichos estudios la actividad bactericida de las nanopartículas de plata parece deberse predominantemente a la interacción con los grupos tioles de las membranas bacterianas produciendo un incremento en la permeabilidad de la membrana y la pérdida de la fuerza motriz de los protones. Todo esto induce una falta de energía en las células y el flujo de fosfatos, desencadenando la salida al exterior del contenido celular. A su vez, las nanopartículas de plata también producen trastornos en la replicación del ADN de las bacterias.^{67,105–111}

Los mecanismos propuestos para explicar la acción biocida de las nanopartículas de plata son los siguientes: (1) las nanopartículas de plata pueden liberar iones de plata y generar especies reactivas de oxígeno (ROS); (2) interacción con las proteínas de membrana afectando a su correcto funcionamiento; (3) acumulación en la membrana celular afectando a su permeabilidad; y (4) entrada en el interior de la célula donde pueden generarse ROS, liberarse iones de plata y afectar con ello al ADN.¹¹² Sin embargo, el mecanismo de acción biocida de las

nanopartículas de plata aún no ha sido descrito ni entendido en su totalidad.^{69,108,110,112} Las hipotéticas interacciones entre las bacterias y las nanopartículas de plata aparecen ilustradas en la figura 1.13.

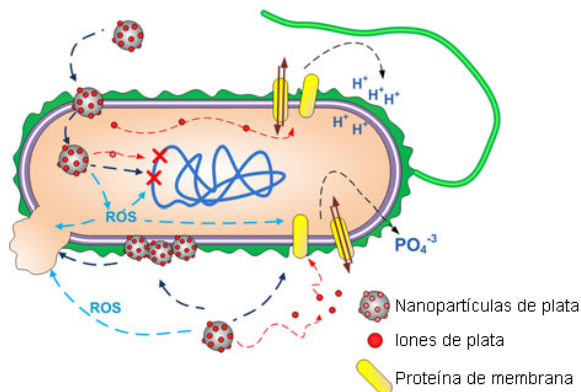


Figura 1.13: Diagrama esquemático de la interacción de las nanopartículas de plata con la membrana celular de una bacteria.

La actividad biocida de las nanopartículas de plata ha sido investigada frente a bacterias gram-negativas, gram-positivas y levaduras.^{3,113,114} Sin embargo, se han encontrado diferencias en la actividad biocida, en función del microorganismo estudiado. En este sentido, el efecto biocida observado por Sondi et al.¹¹³ para las nanopartículas de plata, frente a bacterias gram-negativas y levaduras, fue mayor que el obtenido por Kim et al.³ frente a la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Esto sugiere que los efectos antimicrobianos de las nanopartículas de plata dependen de las características estructurales de la membrana celular que son diferentes para las bacterias gram-positivas y gram-negativas. Las diferencias más significativas estriban en el espesor de la capa de peptidoglicanos, en la rigidez de ésta y en el entrecruzamiento, que dificultan la penetración de las nanopartículas.

Algunos autores proponen que el mecanismo de acción biocida para las nanopartículas de cobre es similar al de las nanopartículas de plata, sin embargo, es mucho más desconocido y necesita ser estudiado en mayor profundidad.^{5,105,108,115–117} Además, la presencia de nanopartículas de cobre en el medio da lugar a iones Cu^{2+} , posiblemente por la presencia de una capa de óxido de cobre sobre las nanopartículas de cobre metálico y por la reacción con los iones cloruro del medio. Estos iones Cu^{2+} también tienen un efecto biocida según han determinado diferentes autores, ya que pueden adherirse a la pared bacteriana cargada negativamente y romperla, afectando a los procesos bioquímicos de la célula, produciendo la desnaturalización de las proteínas y finalmente, la muerte celular.^{67,68,108,118–120}

Los efectos biocidas de las nanopartículas forman parte de un campo de investigación muy extenso y de gran interés, como consecuencia de sus potenciales aplicaciones biomédicas. En este sentido, la aparición de la resistencia de ciertas bacterias frente a los antibióticos y la limitación en el uso de algunos de ellos, debido a que pueden causar enfermedades graves, ha incentivado la investigación de los efectos sinérgicos de las nanopartículas de plata y cobre con diferentes antibióticos como la ampicilina, kanamicina, eritromicina y cloranfenicol.^{76,121} Además, estudios recientes revelan que los microorganismos generalmente no desarrollan resistencia a la plata, lo que la convierte en un óptimo agente biocida.¹²²

1.5. Principales problemas de las nanopartículas

Las nanopartículas pueden ser perjudiciales para la salud y el medioambiente debido a su gran reactividad, la cual es consecuencia del pequeño tamaño y la elevada superficie específica que presentan. Esta reactividad es la responsable también de la alta tendencia a la aglomeración.

1.5.1. Toxicidad

El desarrollo de la nanotecnología ha supuesto la manipulación de nanopartículas en los laboratorios y la aparición de las mismas en productos de consumo. Por ello, es necesario evaluar sus posibles efectos adversos sobre la salud y el medio ambiente.^{123–127} Debido a la reactividad y al pequeño tamaño de las nanopartículas su manipulación puede ser, incluso, más perjudicial que la de las partículas de mayor tamaño del mismo material, ya que pueden infiltrarse en el cuerpo humano por los pulmones, por contacto con la piel o mediante el tracto gastrointestinal.^{64,128–134} Una vez introducidas en el cuerpo por cualquiera de las vías anteriores, las nanopartículas se incorporan al torrente sanguíneo, linfático y al sistema nervioso, llegando a multitud de tejidos y órganos, entre ellos el cerebro, trastornando su funcionamiento.^{135–138} La ruta de acceso al órgano o a la célula suele ser la difusión o el transporte intracelular activo. Sin embargo, no existe mucha información al respecto por lo que resulta necesario el estudio del comportamiento de estas nanopartículas.

Según se muestra en la figura 1.14, las partículas inhaladas pueden depositarse en diferentes partes del aparato respiratorio (región extra-torácica donde se incluyen boca, fosas nasales, faringe y laringe; región traqueo-bronquial y la región alveolar que comprende también los bronquiolos) en función de su tamaño. También influyen en el porcentaje de deposición la forma y la composición química.^{139,140}

El 1 de junio de 2007 entró en vigor una nueva política de regulación de las sustancias químicas en la Unión Europea, llamada REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) que sustituyó alrededor de 40 normativas y directivas europeas. El objetivo de esta nueva normativa es tener un único sistema de regulación para proteger tanto la salud como el medioambiente y al mismo tiempo incentivar la innovación en compuestos químicos ecológicos.^{141,142}

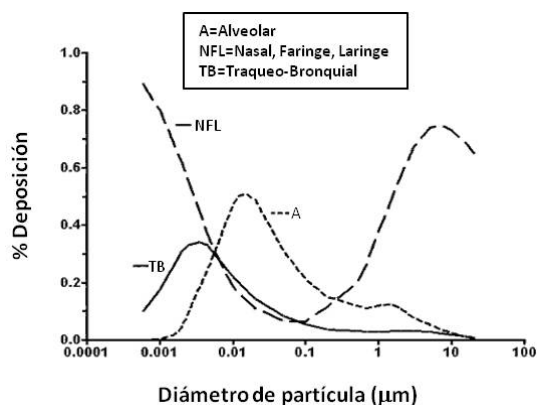


Figura 1.14: Fracciones depositadas de partículas inhaladas con un tamaño comprendido entre 0,6nm y 20μm en las regiones alveolar, naso-faríngea y traqueo-bronquial del tracto respiratorio¹⁴⁰.

Las potenciales aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata y cobre hacen necesario evaluar la citocompatibilidad y la capacidad para restaurar la morfología natural de los tejidos en contacto con ellas sin provocar inmunogenicidad. Recientemente se están desarrollando numerosas investigaciones sobre los efectos de las nanopartículas en la salud. Un estudio realizado por Gopinath et al.¹⁴³ revela que las nanopartículas pueden atravesar fácilmente las membranas celulares y causar efectos severos sobre la salud humana, concluyendo que las nanopartículas de plata en cantidades superiores a 44ppm producen la necrosis de las células. Otro estudio pone de manifiesto que las nanopartículas de plata pueden entrar en el sistema cardiovascular y acumularse posteriormente en la sangre, hígado, bazo, riñones, cerebro y corazón.¹⁴⁴ Se han elaborado métodos para evaluar la viabilidad celular tales como: el ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro], el ensayo LDH (lactato deshidrogenasa) y ensayos de apoptosis/necrosis. Estos ensayos de citotoxicidad *in vitro* revelan que la

toxicidad parece estar asociada a la presencia de nanopartículas metálicas libres, mientras que las nanopartículas recubiertas parecen ser mucho menos citotóxicas.^{114,145–150} Como consecuencia de todas estas investigaciones se concluye que para poder usar los materiales nanoestructurados en el tratamiento y prevención de enfermedades e infecciones, en aplicaciones en dispositivos médicos, o como dosificadores de antibióticos se requiere estudiar en profundidad la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las nanopartículas en el cuerpo humano. En este sentido, es necesario desarrollar estudios *in vivo* para asegurar la aplicación de las nanopartículas sin riesgos para la salud.⁶⁴

Por otra parte, las nanopartículas también tienen efectos tóxicos sobre el medio ambiente. Se ha demostrado que la plata inhibe el crecimiento de ciertas comunidades beneficiosas de microorganismos que viven en el suelo y que son responsables de la fijación del nitrógeno, del suministro de nutrientes esenciales o de la descomposición de la materia orgánica.^{64,151–152} También causa efectos nocivos sobre los sistemas acuáticos afectando a los microorganismos y peces que viven en los ríos, lagos, etc. Por ejemplo, en el caso de los peces, la toxicidad parece ser debida únicamente a la plata iónica, Ag^+ , que inhibe la actividad basolateral de Na^+ , K^+ -ATPasa en las agallas, impidiendo la regulación osmótica de los peces.^{153,154}

Es necesario resaltar que los efectos nocivos sobre la salud y el medio ambiente de las nanopartículas de plata y cobre aún no han sido entendidos completamente. Lo que sí se ha concluido tras numerosos estudios es que, en cantidades pequeñas y razonables, las nanopartículas de plata o cobre no tienen efectos adversos sobre la salud humana ni sobre el medioambiente.⁶⁴

1.5.2. Aglomeración

La aglomeración es otro de los principales problemas que presentan las nanopartículas, como consecuencia de su gran superficie específica, lo cual

se traduce en una elevada relación superficie/volumen.^{155–159} A su vez, los enlaces formados mediante fuerzas de Van de Waals dan lugar a aglomerados. Como consecuencia de esta agregación, las propiedades específicas que poseían las nanopartículas derivadas de su pequeño tamaño se pierden.

Una vía para evitar la aglomeración y coalescencia de las nanopartículas así como los problemas de salud que conlleva su manipulación, es soportarlas o embeberlas en una matriz.

El uso de una matriz que se disuelva lentamente en un fluido aporta, además, la gran ventaja de permitir la dosificación de las nanopartículas, de manera que se incrementa notablemente la durabilidad del material nanoparticulado y sobre todo, al ser liberadas paulatinamente al medio, se evitan los problemas de salud y medioambiente asociados a ellas.

1.6. El vidrio como matriz

Para poder liberar controladamente las nanopartículas se requiere de una matriz cuya solubilidad pueda ser controlada. La solubilidad del vidrio puede modificarse en función de su composición, por lo que es posible diseñar vidrios con solubilidades determinadas. La corrosión de un vidrio se puede resumir en cuatro etapas^{160,161}:

1. Difusión del agua por la red vítrea donde los iones modificadores presentes en la estructura del vidrio (en general iones alcalinos y alcalinotérreos) son sustituidos por los protones del agua o del ácido.
2. Hidrólisis de la red. Se produce la ruptura de los enlaces estructurales Si-O, lo cual acelera disolución del vidrio.
3. Formación de una capa amorfa superficial. Esta capa es rica en sílice, pero no tiene carácter estructural por lo que fácilmente se desprende,

como se observa en la figura 1.15, facilitando que el ataque hidrolítico comience de nuevo.

4. Ataque de la red del vidrio por iones hidroxilo (OH^-). En esta etapa juega un papel importante la composición del vidrio. La cinética de disolución de un vidrio se determina mediante un ensayo normalizado de resistencia hidrolítica, como el propuesto por Day et al.,¹⁶² usando agua destilada a 90°C , una columna de destilación *Soxhlet* y probetas de dimensiones $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$.

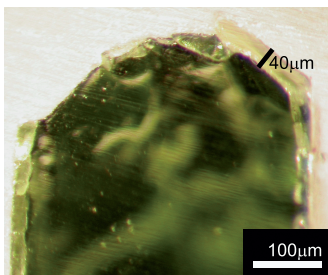


Figura 1.15: Sección transversal de una probeta de un vidrio V-3 de elevada solubilidad (tabla 1.3) después de 14 días de ataque hidrolítico, donde se muestra una capa exterior rica en sílice amorfa con un espesor de $\sim 40 \mu\text{m}$.¹⁶¹

En la figura 1.16 se comparan las velocidades de disolución de tres vidrios con distintas composiciones químicas (tabla 1.3). De ellas se desprende que variaciones relativamente pequeñas en la composición de los vidrios (sobre todo el contenido en elementos alcalinos) afectan notablemente a su velocidad de disolución. Es decir, se puede controlar la resistencia hidrolítica modificando la hidrólisis del enlace Si-O. De esta manera, se puede incrementar la velocidad de disolución aumentando el contenido en elementos alcalinos (Na_2O), bien o disminuirla añadiendo Al_2O_3 para estabilizar la red vítrea.¹⁶³

Como se aprecia en la figura 1.16 el vidrio menos soluble es el vidrio de botella clásico. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha elegido un vidrio sodocálcico con una composición química próxima a la de un típico vidrio de botella.

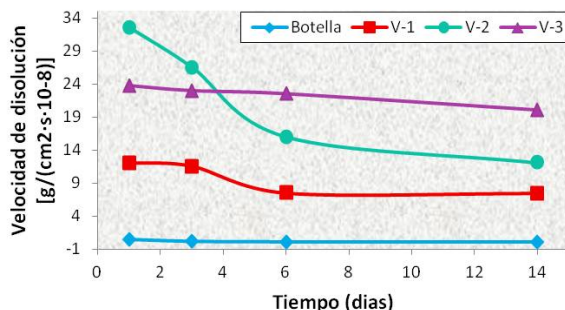
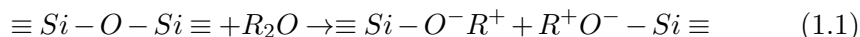


Figura 1.16: Velocidad de disolución frente al tiempo para los vidrios V-1, V-2, V-3 y un vidrio de botella.

Los vidrios sodocálcicos, como consecuencia de su estructura, poseen temperaturas de fusión y de deformación inferiores a las de los vidrios de sílice. Esta disminución en los puntos de fusión y de deformación del vidrio se consigue añadiendo a la sílice óxidos modificadores de red, que suelen ser óxidos alcalinos y alcalinotérreos. De esta manera, por cada molécula de óxido modificador que se añade a la sílice se rompe un enlace Si-O-Si para poder incorporar el oxígeno adicional y con ello los dos silicios vecinos ya no quedan unidos al mismo oxígeno sino a dos diferentes, creando lo que se conoce como dos oxígenos no puente:



Los oxígenos no puente (ONP) están unidos a un solo átomo de silicio, en lugar de a dos como el resto, dando lugar a puntos de discontinuidad

Óxido	V-1	V-2	V-3	Botella
SiO ₂	60,0	61,3	61,7	71,1
Na ₂ O	24,10	25,6	29,6	14,2
CaO	4,2	4,3	1,3	8,5
K ₂ O	0,2	0,2	0,1	1,1
Al ₂ O ₃	10,6	7,8	4,8	1,5
MgO	0,3	0,3	0,2	2,9
Fe ₂ O ₃	0,1	0,2	0,2	0,5
Cr ₂ O ₂	-	-	0,8	-
NiO	-	-	0,4	-
CuO	-	-	0,2	-
ZnO	-	-	0,1	-
PbO	-	-	-	-
Otros	0,5	0,3	0,6	0,2

Tabla 1.3: Composición química de los vidrios V-1, V-2, V-3 y botella.

reticular como se muestra en la figura 1.17. La carga negativa de los ONP es neutralizada por la carga positiva del catión modificador. En el caso de los cationes alcalinotérreos el deterioro reticular se compensa, en parte, porque actúan como iones puente entre dos oxígenos gracias a su doble carga positiva (figura 1.17B). Cuanto mayor es la proporción de óxidos modificadores mayor es el número de puntos de rotura y, por tanto, más se debilita la red, lo cual se traduce en una disminución de la temperatura de reblandecimiento, un debilitamiento de la rigidez mecánica, un aumento en el coeficiente de dilatación térmica, un empeoramiento de la resistencia al choque térmico y un mayor riesgo de desvitrificación. De acuerdo con estos extremos, al vidrio de sílice se le pueden incorporar óxidos modificadores hasta alcanzar una determinada proporción, para la cual la cohesión reticular resulta tan pequeña que se produce la desvitrificación.¹⁶⁴

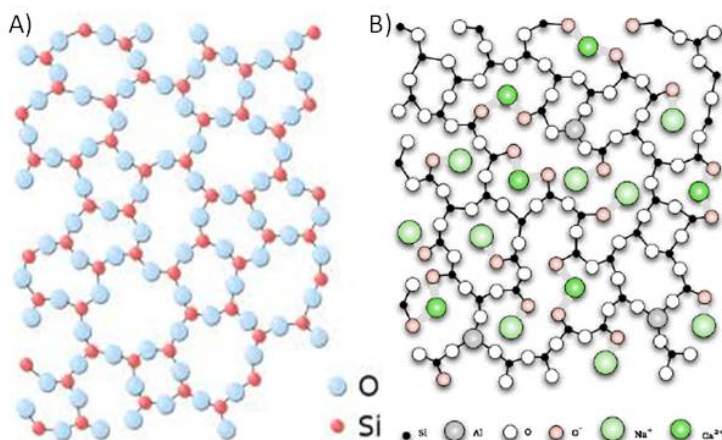


Figura 1.17: Estructura de un vidrio de sílice (A). Retículo distorsionado de un vidrio de sílice modificado por la incorporación de Na_2O , CaO y Al_2O_3 (B). El cuarto átomo de oxígeno de cada tetraedro $[\text{SiO}_4]$ se encuentra situado por encima o por debajo del plano de la figura.

1.7. Fuentes de nanopartículas de Ag y Cu

El proceso de incorporación de nanopartículas a una matriz es complejo debido a la elevada tendencia a la aglomeración y a la coalescencia de las nanopartículas, como se ha mencionado anteriormente. Esto puede solventarse embebiendo o soportando previamente las nanopartículas en otra matriz. En este caso es importante que la matriz elegida pueda incorporarse completamente a la matriz vítrea, permitiendo a las nanopartículas dispersarse homogéneamente en el seno de dicha matriz. Por este motivo, en el presente trabajo de tesis se han seleccionado para su estudio diversos sistemas particulados nanoestructurados de bajo coste, susceptibles de ser incorporados a una matriz vítrea, tales como sepiolita, caolín, metacaolín, montmorillonita y diatomeas conteniendo nanopartículas de plata o cobre.

1.8. Objetivos

En este trabajo de tesis se pretenden alcanzar dos objetivos fundamentales:

1. La obtención de nanopartículas de cobre o plata monodispersas en una matriz constituida por un vidrio sodocálcico. Se pretende que estos materiales nanoestructurados sean agentes biocidas dosificadores de nanopartículas. Con esto se consigue que la liberación de éstas sea paulatina, para así evitar los posibles efectos adversos sobre la salud y el medioambiente, y lograr que estos agentes biocidas sean de larga duración.
2. La obtención de recubrimientos con carácter biocida sobre materiales cerámicos y sobre la aleación de titanio Ti-6Al-4V, para su posterior aplicación en prótesis o implantes médicos. Con ello, se pretende evitar los problemas actuales asociados a infecciones microbianas.

1.9. Bibliografía

1. Q Chang, H He, J Zhao, M Yang et al. Bactericidal activity of a Ce-promoted Ag/AlPO₄ catalyst using molecular oxygen in water. *Environ. Sci. Technol.* 2008;42(5):1699-1704.
2. SP Tian, Q Fan, Y Xu, AL Jiang. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathol.* 2002;51(3):352-358.
3. JS Kim, E Kuk, KN Yu, JH Kim et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med* 2007;3:95-101.
4. M Fang, JH Chen, XL Xu, PH Yang et al. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006;27(6):513-517.
5. CC Trapalis. Study of antibacterial composite Cu/SiO₂ thin coatings. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2003;26(1-3):1213-1218.
6. DG Allison. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
7. J Jass, S Surman, JT Walker. Medical biofilms: detection, prevention, and control. West Sussex: Wiley and Sons; 2003.
8. I Banerjee, RC Pangule, RS Kane. Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Adv. Mater.* 2011;23(6):690-718.
9. IK Konstantinou, TA Albanis. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.* 2004;30(2):235-248.
10. E Eguía, A Trueba, B Rio, M Girón et al. Recent studies on antifouling systems to artificial structures in marine ecosystem. *J. Marit. Res.* 2006;3(1):73-89.

11. HMSO. Pesticides reference book 500. London: HMSO; 1998.
12. KV Thomas. The environmental fate and behavior of antifouling paint booster biocides: a review. *Biofouling* 2001;17:73-86.
13. N Voulvoulis, MD Scrimshaw, JN Lester. Alternative antifouling biocides. *Appl. Organomet. Chem.* 1999;13:135-143.
14. N Voulvoulis, MD Scrimshaw, JN Lester. Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints. *Chemosphere* 2002;47:789-795.
15. SG Boodman, B Maloney. Replaceable You. *The Washington Post* 2007 September 17.
16. B Meier. Absence of Warranties for Implants Costs Health System. *The New York Times* 2010 April 2. New York.
17. H Schein. Henry Schein Enters Growing Dental Implant Category Through Strategic Partnership with Camlog. *Business Wire* 2004 July 6. Melville, N.Y.
18. AD Pye, DEA Lockhart, MP Dawson, CA Murray et al. A review of dental implants and infection. *J. Hosp. Infect.* 2009;72(2):104-110.
19. JB Park, JD Bronzino. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Ratón: CRC Press; 2003. p 1-241.
20. S Ramakrishna, J Mayer, E Wintermantel, KW Leong. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Compos. Sci. Technol.* 2001;61(9):1189-1224.
21. DL Wise. *Biomaterials engineering and devices*. Berlín: Humana Press; 2000. p 205-319.
22. AP Tomsia, M Launey, J Lee, M Mankani et al. Nanotechnology Approaches to Improve Dental Implants. *Int. J. Oral Max. Impl.* 2011;26 Suppl.:25-44.

23. LL Hench, JR Jones. Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering. Cambridge: Woodhead; 2005.
24. M Geetha, AK Singh, R Asokamani, AK Gogia. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. Prog. Mater. Sci. 2009;54(3):397-425.
25. DB McGregor, RA Baan, C Partensky, JM Rice et al. Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies - A report of an IARC Monographs Programme Meeting. Eur. J. Cancer 2000;36(3):307-313.
26. Y Okazaki, E Gotoh. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. Biomaterials 2005;26(1):11-21.
27. KL Wapner. Implications of metallic corrosion in total knee arthroplasty. Clin. Orthop. Relat. Res. 1991(271):12-20.
28. M Geetha, AK Singh, AK Gogia, R Asokamani. Effect of thermomechanical processing on evolution of various phases in Ti-Nb-Zr alloys. J. Alloys Compd. 2004;384(1-2):131-144.
29. D Kuroda, H Kawasaki, S Hiromoto, K Hanawa, S. et al. Titanium 2003 science and technology. Weinham: Wiley-VCH Verlag; 2003. p 3174.
30. JI Qazi, B Marquardt, LF Allard, HJ Rack. Phase transformations in Ti-35Nb-7Zr-5Ta-(0.06-0.68)O alloys. Mater. Sci. Eng., C 2005;25(3):389-397.
31. N Sakaguchi, M Niinomi, T Akahori, J Takeda et al. Relationships between tensile deformation behavior and microstructure in Ti-Nb-Ta-Zr system alloys. Mater. Sci. Eng., C 2005;25(3):363-369.
32. N Sakaguchi, M Niinomi, T Akahori, J Takeda et al. Effect of Ta content on mechanical properties of Ti-30Nb-XTa-5Zr. Mater. Sci. Eng., C 2005;25(3):370-376.

33. X Tang, T Ahmed, HJ Rack. Phase transformations in Ti-Nb-Ta and Ti-Nb-Ta-Zr alloys. J. Mater. Sci. 2000;35(7):1805-1811.
34. M Niinomi. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. J. Mech. Behav. Biomed. 2008;1(1):30-42.
35. A Czyrska-Filemonowicz, PA Buffat, T Wierzchon. Microstructure and properties of hard layers formed by duplex surface treatment containing nickel and phosphorus on a titanium-base alloy. Scr. Mater. 2005;53(12):1439-1442.
36. JB Brunski. Capítulo: Ratner PD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. California: Elsevier Academic Press; 2004. p 137.
37. G Turner, D Lacroix, JA Planell. Biomedical Materials. New York (USA): Springer; 2009.
38. AS Hoffman, HL L., S Best. Biomaterials Science. San Diego (USA): Elsevier; 2004.
39. SE Cramton, C Gerke, F Gotz. In vitro methods to study *staphylococcal* biofilm formation. Methods in Enzymol. 2001;336:239-255.
40. RM Donlan, JW Costerton. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiol. Rev. 2002;15(2):167-193.
41. KJ Bozic, MD Ries. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. J. Bone Joint Surg. [Am] 2005;87(8):1746-1751.
42. G Colon, CW Brian, TJ Webster. Increased osteoblast and decreased *Staphylococcus epidermidis* functions on nanophase ZnO and TiO₂. J. Biomed. Mater. Res. 2006;78(3):595-604.

43. PK Singh, MR Parsek, EP Greensberg, MJ Welsh. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 2002;417(6888):552-555.
44. JE Block, HA Stubbs. Reducing the risk of deep wound infection in primary joint arthroplasty with antibiotic bone cement. *Orthopedics* 2005;28(11):1334-1345.
45. MJ Dunbar. Antibiotic bone cements: Their use in routine primary total joint arthroplasty is justified. *Orthopedics* 2009;32(9):660.
46. AD Hanssen. Prophylactic use of antibiotic bone cement: An emerging standard-In opposition. *J. Arthroplasty* 2004;19(4):73-77.
47. W Jiranek, A Hanssen, AS Greenwald. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J. Bone Joint Surg.[Am]* 2006;88(11):2487-2500.
48. TN Joseph, AL Chen, PE Di Cesare. Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2003;11(1):38-47.
49. RS Namba, Y Chen, EW Paxton, T Slipchenko et al. Outcomes of routine use of antibiotic-loaded cement in primary total knee arthroplasty. *J. Arthroplasty* 2009;24(6 Suppl.):44-47.
50. W Jiranek. Antibiotic-loaded cement in total hip replacement: Current indications, efficacy, and complications. *Orthopedics* 2005;28(8 Suppl.):s873-s877.
51. J Jung, N Schmid, J Kelm, E Schmitt et al. Complications after spacer implantation in the treatment of hip joint infections. *Int. J. Med. Sci.* 2009;6(5):265-273.
52. CY Flores, C Díaz, A Rubert, GA Benítez et al. Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci.* 2010;350(2):402-408.

53. BTJ Johnson. Capítulo: Chapter 2: Suppressed medicines (pharmaceutical companies)". Victoria (Canadá): Trafford; 2008.
54. QL Feng, J Wu, GQ Chen, FZ Cui et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Biomed. Mater. Res. 2000;52(4):662-668.
55. S Silver, LT Phung. Bacterial heavy metal resistance: New surprises. Annu. Rev. Microbiol. 1996;50:753-789.
56. G Carotenuto, GP Pepe, N L. Preparation and characterization of nano-sized Ag/PVP composites for optical applications. Eur. Phys. J. B 2000;16(1):11-17.
57. JH Crabtree, RJ Burchette, RA Siddiqi, IT Huen et al. The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. Perit. Dial. Int. 2003;23(4):368-374.
58. JW Alexander. History of the medical use of silver. Surg. Infect. 2009;10(3):289-292.
59. J Aaseth, A Olsen, J Halse, T Hovig. Argyria - tissue deposition of silver as selenide. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1981;41(3):247-251.
60. JE Furchner, CR Richmond, GA Drake. Comparative metabolism of radionuclides in mammals-IV. Retention of silver-110m in the mouse, rat, monkey, and dog. Health phys. 1968;15(6):505-514.
61. RF Phalen, PE Morrow. Experimental inhalation of metallic silver. Health phys. 1973;24(5):509-518.
62. J Rungby, G Danscher. Localization of exogenous silver in brain and spinal cord of silver exposed rats. Acta Neuropathol. 1983;60(1-2):92-98.
63. J Rungby, G Danscher. Neuronal accumulation of silver in brains of progeny from argyric rats. Acta Neuropathol. 1983;61(3-4):258-262.

64. NR Panyala, EM Pena-Mendez, J Havel. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? . J. Appl. Biomed. 2008;6(3):117-129.
65. EW Flick. Capítulo: "Mooney Chemicals". New Jersey: Noyes; 1987. p 183-185.
66. GE Mc Donnell. Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance. Whashington, D. C.: ASM Press; 2007.
67. YSE Lin, RD Vidic, JE Stout, CA McCartney et al. Inactivation of *Mycobacterium avium* by copper and silver ions. Water Res. 1998;32(7):1997-2000.
68. YSE Lin, RD Vidic, JE Stout, VL Yu. Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of *Legionella pneumophila*. Water Res. 1996;30(8):1905-1913.
69. JR Morones, JL Elechiguerra, A Camacho, K Holt et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005;16(10):2346-2353.
70. T Taton, C Mirkin. Materials chemistry - Semiconductors meet biology. Nature 2000;405(6787):626-627.
71. CA Mirkin, TA Taton. Semiconductors meet biology. Nature 2000;405:626-627.
72. R Burchette, R Siddiqi, L Huen, L Hadnott et al. Efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. Perit. Dial. Int. 2003;23(4):368-374.
73. M Catauro, MG Raucci, F De Gaetano, A Marotta. Antibacterial and bioactive silver-containing Na₂O-CaO-2SiO₂ glass prepared by sol-gel method. J. Mater. Sci. - Mater. Med. 2004;15(7):831-837.

74. S Pal, YK Tak, JM Song. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2007;73(6):1712-1720.
75. V Sambhy, MM MacBride, BR Peterson, A Sen. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: Dual action tunable antimicrobial materials. J. Am. Chem. Soc. 2006;128(30):9798-9808.
76. R Klippstein, R Fernández-Montesinos, PM Castillo, AP Zaderenko et al. Capítulo: "Silver nanoparticles interactions with the immune system: implications for health and disease". India: In-Teh; 2010.
77. SW Charles, J Popplewell. Capítulo: "Properties and applications of magnetic liquids". Buschow KHJ, editor. Handbook of Magnetic Materials. Amsterdam: Elsevier; 1986. p 153.
78. AE Merbach, E Tóth. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. Chichester, UK: Wiley; 2001.
79. M Ozaki, S Kratochvil, E Matijevic. Formation of monodispersed spindle-type hematite particles. J. Colloid Interface Sci. 1984;102:146-151.
80. K O'Grady, RL White, PJ Grundy. Whither magnetic recording. J. Magn. Mater. 1998;177-181:886-891.
81. SI Iwasaki. Development of perpendicular magnetic recording conference. J. Magn. Mater. 2005;287:1-8.
82. G Mie. Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions. Annalen der Physik 1908;25(3):377-445.
83. JP Wilcoxon, A Martino, RL Baughmann, E Klavetter et al. Synthesis of Transition Metal Clusters and Their Catalytic and Optical Properties. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 1993;286:131-136.

84. H Bönenman, W Brijoux. Advanced Catalyst and Nanostructured Materials. San Diego, USA: Academia Press; 1996.
85. E Kelly. La década decisiva: Norma; 2006.
86. Z Huang, H Chen, A Yip, G Ng, Guo, F. et al. Longitudinal patent analysis for nanoscale science and engineering: Country, institution and technology field. J. Nanopart. Res. 20 03;5(3-4):333-363.
87. Project on Emerging Nanotechnologies. 2012 Disponible en: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft
88. HJ Freund. Clusters and islands on oxides: from catalysis via electronics and magnetism to optics. Surf. Sci. 2002;500(1-3):271-299.
89. I Borgia, B Brunetti, I Mariani, A Sgamellotti et al. Heterogeneous distribution of metal nanocrystals in glazes of historical pottery. Appl. Surf. Sci. 2002;185(3-4):206-216.
90. JW Mellor. A comprehensive treatise on inorganic and theoretical chemistry. London, Uk: Longmans, Green and Co.; 1923.
91. FE Wagner, S Haslbeck, L Stievano, Sb Calogero et al. Before striking gold in gold-ruby glass. Nature 2000;407(6805):691-692.
92. O Bobin, M Schvoerer, JL Miane, JF Fabre. Coloured metallic shine associated to lustre decoration of glazed ceramics: A theoretical analysis of the optical properties. J. Non-Cryst. Solids 2003;332(1-3):28-34.
93. WD Kingery, HK Bowen, DR Uhlmann. Introduction to Ceramics. London: John Wiley & Sons; 1975.
94. AC Smith. Lustre pottery. New York: New Amsterdam Books; 1991.

95. P Rawson. *Ceramics*: University of Pennsylvania Press; 1984.
96. G Fehervari. *Ceramis of the Islamic world*. London, Uk: I. B. Tauris and Co.; 2000.
97. T Pradell, A Climent-Font, J Molera, A Zucchiatti et al. Metallic and nonmetallic shine in luster: An elastic ion backscattering study. *J.Appl. Phys.* 2007;101(10):art. no. 103518
98. T Pradell, J Molera, C Bayés, P Roura. Luster decoration of ceramics: Mechanisms of metallic luster formation. *Appl. Phys. A* 2006;83(2):203-208.
99. T Pradell, J Molera, J Roque, M Vendrell-Saz et al. Ionic-exchange mechanism in the formation of medieval luster decorations. *J. Am. Ceram. Soc.* 2005;88(5):1281-1289.
100. E Gaffet, F Bernard, J-C Niepce, F Charlot et al. Some recent developments in mechanical activation and mechanosynthesis. *J. Mater. Chem.* 1999;9(1):305-314.
101. J Park, E Kang, SU Son, HM Park et al. Monodisperse nanoparticles of Ni and NiO: Synthesis, characterization, self-assembled superlattices, and catalytic applications in the suzuki coupling reaction. *Adv. Mater.* 2005;17(4):429-434.
102. JL Elechiguerra, JL Burt, JR Morones, A Camacho et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnol.* 2005;3.
103. L Lu, RWY Sun, R Chen, CK Hui et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral therapy* 2008;13(2):252-262.
104. HJ Klasen. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 2000;26(2):131-138.
105. SJ Stohs, D Bagchi. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;18(2):321-336.

106. V Alt, T Bechertb, P Steinruckeb, M Wagenerc et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004;25(18):4383-4391.
107. Q Chang, L Yan, M Chen, H He et al. Bactericidal mechanism of Ag/Al₂O₃ against *Escherichia coli*. *Langmuir* 2007;23(22):11197-11199.
108. JP Ruparelia, AK Chatterjee, SP Duttagupta, S Mukherji. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 2008;4(3):707-716.
109. KY Yoon, JH Byeon, JH Park, H J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 2007;373(2-3):572-575.
110. SK Gogoi, P Gopinath, A Paul, A Ramesh et al. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir* 2006;22(22):9322-9328.
111. CN Lok. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* 2006;5(4):916-924.
112. C Marambio-Jones, E Hoek. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanopart. Res.* 2010;12(5):1531-1551.
113. I Sondi, B Salopek-Sondi. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 2004;275(1):177-182.
114. DG Yu. Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na⁺-poly(γ -glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process. *Colloid Surface B* 2007;59(2):171-178.

115. JH Kim, H Cho, SE Ryu, CM U. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: Highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{2+} ion. Arch. Biochem. Biophys. 2000;382(1):72-80.
116. AM Mulligan, M Wilson, JC Knowles. The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. Biomaterials 2003;24(10):1797-1807.
117. S Jang. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. J. Biol. Chem. 2007;282(2):929-937.
118. N Cioffi, N Ditaranto, L Torsi, RA Picca et al. Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. Anal. Bioanal. Chem. 2005;381(3):607-616.
119. A Schrand, M Rahman, S Hussain, J Schlager et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. WIREs Nanomed.Nanobiotechnol. 2010;2(5):544-568.
120. Z Chen, H Menga, G Xing, C Chena et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. Toxicol. Lett. 2006;163(2):109-120.
121. EY Furuya, FD Lowy. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. Nature Reviews Microbiology 2006;4(1):36-45.
122. AB Lansdown. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. J. Wound Care 2002;11(4):125-130.
123. DW Dockery, CA Pope, X Xu, JD Spengler et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. N. Engl. J. Med. 1993;329(24):1753-1759.
124. BT Mossman, J Bignon, M Corn, A Seaton et al. Asbestos: Scientific developments and implications for public policy. Science 1990;247(4940):294-301.

125. CA Pope, J Schwartz, MR Ransom. Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley. *Arch. Environ. Health* 1992;47(3):211-217.
126. J Schwartz. Air pollution and daily mortality: A review and meta analysis. *Environ. Res.* 1994;64(1):36-52.
127. A Seaton, L Tran, R Aitken, K Donaldson. Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J. R. Soc. Interface* 2009;doi: 10.1098/rsif.2009.0252.focus
128. AM Schrand, MF Rahman, SM Hussain, JJ Schlager et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*;2(5):544-568.
129. K Donaldson, F Murphy, A Schinwald, R Duffin et al. Identifying the pulmonary hazard of high aspect ratio nanoparticles to enable their safety-by-design. *Nanomed.* 2011;6(1):143-153.
130. K Soto. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater.* 2007;3(3 SPEC. ISS.):351-358.
131. PJ Anderson, JD Wilson, FC Hiller. Respiratory tract deposition of ultrafine particles in subjects with obstructive or restrictive lung disease. *Chest* 1990;97(5):1115-1120.
132. K Donaldson, D Brown, A Clouter, R Duffin et al. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 2002;15(2):213-220.
133. KL Dreher. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2004;77(1):3-5.
134. G Oberdörster. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhalation Toxicol.* 1996;(8 Suppl.):73-89.

135. C Buzea, I Pacheco, K Robbie. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2007;2(4):MR17-MR71.
136. WG Kreyling, M Semmler, F Erbe, P Mayer et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 2002;65(20):1513-1530.
137. W MacNee, K Donaldson. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur. Respir. J.* 2003;21(40):47S-51S.
138. G Oberdörster, E Oberdörster, J Oberdörster. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005;113(7):823-839.
139. Multiple Path Aerosol Dosimetric model (MPPD v1.0). 2002
Disponible en:
<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/650010030.html>
140. G Oberdörster, Z Sharp, V Atudorei, A Elder et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicol.* 2004;16(6-7):437-445.
141. European Chemicals Agency. Disponible en:
<http://echa.europa.eu/web/guest/regulations/reach/legislation>
142. REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals. Disponible en: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_en.htm
143. P Gopinath, SK Gogoi, A Chattopadhyay, SS Ghosh. Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for *in vitro* gene therapy. *Nanotechnology* 2008;19(7).
144. S Takenaka, E Karg, C Roth, H Schulz et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ. Health Perspect.* 2001;109(Suppl. 4):547-551.

145. PM Castillo, JL Herrera, R Fernandez-Montesinos, C Caro et al. Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomed.* 2008;3(5):627-635.
146. PV AshaRani, GLK Mun, MP Hande, S Valiyaveettil. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;3:279-90.
147. L Braydich Stolle, S Hussain, JJ Schlager, MC Hofmann. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* 2005;88(2):412-419.
148. SM Hussain, KL Hess, JM Gearhart, KT Geiss et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* 2005;19(7):975-983.
149. S Kim, JE Choi, J Choi, KH Chung et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro* 2009;23(6):1076-1084.
150. AV Singh, R Patil, MB Kasture, WN Gade et al. Synthesis of Ag-Pt alloy nanoparticles in aqueous bovine serum albumin foam and their cytocompatibility against human gingival fibroblasts. *Colloid Surface B* 2009;69(2):239-245.
151. Nanosilver-a threat to soil, water and human health? Friends of the Earth Australia. 2007 Disponible en: <http://nano.foe.org.au/node/189>
152. T Murata, M FKanao-koshikawa, T Takamatsu. Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water, Air Soil Pollut.* 2005;164:103-118.

153. AR Flegal, JA Davis, MS Connor, CH Conaway. Sources, transport, fate and toxicity of pollutants in the San Francisco Bay estuary. *J. Environ. Res.* 2007;105:0-4.
154. CM Wood, RC Playle, C Hogstrand. Physiology and modelling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1999;18:71-83.
155. O Cíntora González, C Estournès, M Richard-Plouet, JL Guille. Nickel nano-particles in silica gel monoliths: Control of the size and magnetic properties. *Mater. Sci. Eng., C* 2001;15(1-2):179-182.
156. JA Haber, NV Gunda, WE Buhro. Nanostructure by design: Solution-phase-processing routes to nanocrystalline metals, ceramics, intermetallics, and composites. *J. Aerosol Sci.* 1998;29(5-6):637-645.
157. BS Kim, JS Lee, T Sekino, YH Choa et al. Hydrogen reduction behavior of NiO dispersoid during processing of Al₂O₃/Ni nanocomposites. *Scr. Mater.* 2001;44(8-9):2121-2125.
158. JA Lewis. Colloidal processing of ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* 2000;83(10):2341-2359.
159. NJ Welham, PE Willis, T Kerr. Mechanochemical formation of metal-ceramic composites. *J. Am. Ceram. Soc.* 2000;83(1):33-40.
160. AC Silva. Vidros e vitrocerâmicos com alta concentração de metais obtidos a partir de resíduos industriais. Sao Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Universidade de Sao Paulo); 2008.
161. SRH Mello-Castanho, AC da Silva, A Esteban-Cubillo, C Pecharromán et al. Vidrios de silicato a partir de residuos galvánicos con alto contenido en Cr y Ni. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio* 2006;45(1).

162. DE Day, Z Wu, CS Ray, P Hrma. Chemically durable iron phosphate glass wasteforms. *J. Non-Cryst. Solids* 1998;241(1):1-12.
163. AC Silva, S Mello-Castanho, F Guitian, I Montero et al. Incorporation of galvanic waste (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb) in a Soda-Lime-Borosilicate Glass. *J. Am. Ceram. Soc.* 2008;91(4):1300-1305.
164. JMF Navarro. Capítulo: "El Estadovitreo y la estructura de los vidrios" Consejo Superior de Investigaciones Científicas, editor. *El vidrio*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991. p 94-96.

Capítulo 2

Técnicas y métodos experimentales

En este capítulo se describen las técnicas instrumentales y los procedimientos de caracterización empleados, tanto de los materiales de partida como de los productos y recubrimientos obtenidos. Seguidamente, se exponen los detalles de los ensayos realizados para determinar la actividad biocida y los procesos de lixiviación tanto de los polvos de vidrio como de los recubrimientos.

2.1. Análisis químico

El análisis químico de los elementos alcalinos se realizó mediante espectrofotometría de llama en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 2100. El resto de elementos, a excepción del boro, fueron determinados por espectroscopia de absorción atómica en un espectrómetro de emisión con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). En este caso el equipo utilizado fue el modelo IRIS ADVANTAGE de la compañía Termo Jarrell Ash, equipado con un sistema de visualización dual, una fuente de radiofrecuencia de 40,6MHz,

una red de difracción tipo *Echelle* y un detector de estado sólido de transferencia de carga (CID). Cada elemento absorbe a una longitud de onda específica, lo que permite su identificación y además la radiación a esa longitud de onda específica es proporcional a la cantidad del elemento en la muestra pudiéndose cuantificar.¹ Por último, el boro se determinó mediante volumetría.

Fue necesaria una disgregación previa de las muestras a analizar, disolviéndolas con HF para la determinación de los elementos alcalinos, y con un fundente (mezcla de Na_2CO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) para el resto de elementos.

2.2. Determinación del tamaño de partícula de los materiales en polvo

El tamaño de partícula de los polvos de los materiales de partida y de los polvos de vidrio obtenidos se determinó por difracción con un láser de He-Ne con una longitud de onda de 632,8nm. El polvo a analizar se dispersó en agua destilada mediante la adicción de un surfactante (dolapix), para ser posteriormente introducido en la célula de medición. En esta célula el haz de luz procedente de la fuente láser incide sobre las partículas en suspensión difractándose con diferentes ángulos, según el tamaño de las partículas. El equipo utilizado fue un analizador granulométrico MASTERSIZER modelo 2.18.

2.3. Análisis térmico diferencial (ATD) y termogravimétrico (TG)

Los análisis térmico diferencial (ATD) y termogravimétrico (TG) se efectuaron en un equipo SEIKO modelo EXSTAR 6300. Las medidas se

hicieron en flujo dinámico de aire (200mL/min) con una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta 800°C. Se emplearon crisoles de alúmina para evitar la aleación de la plata con el titanio. El material de referencia utilizado fue $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$.

2.4. Difracción de Rayos X

La difracción de Rayos X se empleó para evaluar la desvitrificación del vidrio en los polvos de vidrio sinterizados y en los recubrimientos obtenidos. Esta técnica también permitió determinar la presencia de plata y cobre metálicos tanto en los materiales de partida como en los productos finales. Todos los análisis de difracción fueron realizados a 40kV y 30mA en un difractómetro BRUKER D8 ADVANCE, empleando la radiación K_α del cobre ($\lambda=1,5418\text{\AA}$). Los datos se registraron en modo *step-scanning* con un tamaño de paso de $0,028^\circ$ y un tiempo de acumulación de cuentas de 2,5 segundos.

2.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Mediante esta técnica se puede obtener información sobre la estructura del vidrio. Los espectros de RMN de ^{29}Si se registraron en un equipo Bruker AVANCE 400. Se utilizaron secuencias de pulso sencillas que irradian la muestra a la frecuencia de resonancia de los núcleos estudiados para un campo magnético de 9,4T. Las muestras se colocaron en rotores de circona que giran alrededor del ángulo mágico ($54^\circ44'$ con respecto al campo magnético) en el interior de la sonda a una velocidad de 10kHz. Las condiciones de registro fueron: frecuencia de resonancia de 79,49MHz, pulso de 90° y $5\mu\text{s}$, 800 adquisiciones de señal por muestra y tiempo de relajación de la señal entre 5-10s. La señal química obtenida se midió en partes por millón (ppm), tomando como patrón de referencia la señal del tetrametilsilano (TMS).

2.6. Espectroscopia UV-visible

El espectro de absorción de los materiales de partida y de los polvos de vidrio con nanopartículas metálicas se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-VIS Modelo JASCO V-660. Las muestras se diluyeron en bromuro potásico (KBr) para obtener una concentración del metal de 0,2% en peso.

2.7. Espectroscopia infrarroja (IR)

Los espectros infrarrojos se midieron en un espectrofotómetro de IR Bruker IFS 66V-S por transformada de Fourier. Mediante las bandas de absorción se puede obtener información de los grupos funcionales presentes en la muestra. El equipo tiene una resolución de 2cm^{-1} y posee un detector de sulfato de triglicina (TGS). Las muestras se dispersaron en una matriz de KBr con una concentración $<1\%$ y se prensaron a 4MPa.

2.8. Microscopía de calefacción

La microscopía de calefacción se utiliza para determinar el comportamiento a la fusión de los vidrios estudiados. Los polvos de vidrio se introdujeron en el horno sobre un substrato de alúmina en forma de pastilla de $\sim 2\text{mm}$ de diámetro. La evolución del perfil de la probeta se obtuvo mediante microfotografías o mediante un vídeo de todo el proceso. Mediante esta técnica se midió la variación de la viscosidad de los materiales vítreos con la temperatura y se establecieron los puntos fijos de viscosidad (punto de deformación, punto de semiesfera o media bola, punto de esfera o bola y punto de fluidez)² para poder establecer las condiciones óptimas de sinterizado. La microscopía se realizó en un

microscopio de la marca HESSE en atmósfera de aire empleando como sustrato α -alúmina y una rampa de 5°C/min para el calentamiento, de 10°C/min para el enfriamiento.

2.9. Dilatometría

El coeficiente de dilatación térmica, $\alpha = \frac{\Delta l}{l} \cdot \frac{1}{T} (K^{-1})$, viene determinado por la variación de la longitud en función de la temperatura. Este coeficiente fue medido en un dilatómetro BÄHR THERMOANALYSE modelo DIL 802, con palpador y soporte de alúmina. La contracción o dilatación se registra mediante un captador lineal de desplazamiento inductivo. Esta señal se envía a un ordenador, junto con la obtenida por el termopar (de Pt-Pt/Rh10) del horno. Las medidas se realizaron con probetas en forma de barras de dimensiones variando entre 5-7mm de diámetro y 12-13mm de longitud con caras planoparalelas. La rampa de calentamiento fue de 5°C/min hasta una temperatura final de 500°C.

2.10. Indentación Vickers

La indentación Vickers es una de las técnicas más comunes en la caracterización de las propiedades mecánicas de los materiales^{3,4}. En este tipo de ensayo, un penetrador, que consta de una punta de diamante de geometría piramidal con un vértice de 136° (figura 2.1), presiona la superficie pulida del material dejando una marca o huella con un tamaño proporcional a la carga aplicada. La marca resultante se observa en el microscopio óptico acoplado al microindentador, y se miden las diagonales d_1 y d_2 de la huella. A partir de estas diagonales (en m) y de la carga aplicada P (en N) se puede calcular la dureza Vickers del material (Hv) según la ecuación 2.1:

$$H_v(Pa) = \frac{1,8544 \cdot P(N)}{d_1(m) \cdot d_2(m)} \quad (2.1)$$

Debido a la fragilidad de los vidrios, es necesario controlar la carga aplicada para poder obtener una huella sin el "desconchamiento" de la muestra, que se produce cuando la carga supera el límite elástico del vidrio.

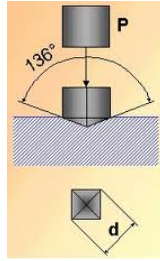


Figura 2.1: Esquema de un penetrador Vickers.

El microindentador utilizado fue un BUEHLER modelo Micromet 5103 con cargas de 200mg y un tiempo de aplicación de 10 segundos. Los ensayos se realizaron sobre superficies pulidas y planoparalelas.

En función de la carga aplicada, se puede conseguir también la aparición de grietas locales que permiten calcular la tenacidad del material según las ecuaciones 2.2 o 2.3, según corresponda.⁵

$$K_{IC} = \frac{0,047 \cdot P}{d^{0,42} \cdot c^{1,08} [f(E/H_V)]}; c/d > 2,8 \quad (2.2)$$

$$K_{IC} = \frac{0,0232 \cdot P}{d \cdot c^{1/2} [f(E/H_V)]}; c/d < 2,8 \quad (2.3)$$

En estas ecuaciones, $[f(E/H_V)] = \frac{(\beta_{exp}^2/\delta)-1,5}{0,75}$; $\delta = \frac{2(1+3\ln\beta_{exp})}{3}$ y $\beta_{exp} = 0,768(E/H_V)^{0,408}$. Siendo H_v la dureza Vickers del material, P la carga aplicada (en N), E el módulo de elasticidad, c la longitud de la grieta y d el radio de la huella de la indentación.

2.11. Perfilometría

La perfilometría es una técnica de muestreo topográfico superficial mediante la cual se obtuvo información de la rugosidad de los recubrimientos. El perfilómetro empleado fue un Form Talysurf Intra. Este equipo consta de un palpador con una punta de diamante con una resolución de 16nm y que se desplaza en un rango de 1mm sobre la pieza a medir en el eje X. Para obtener imágenes en 3 dimensiones se utiliza de forma conjunta una unidad de avance automatizada que se desplaza a lo largo del eje Y hasta 50mm.

2.12. Tratamiento térmico

Para el tratamiento de piezas pequeñas se usó un horno tubular CARBOLITE FURNACES STF 16/75 que alcanza una temperatura máxima de 1600°C y está equipado con un controlador digital de temperatura EUROTHERM que permite programar diferentes ciclos térmicos. Este sistema de control de temperatura está conectado a un termopar de Pt-6%Rh/Pt-30%Rh que mide la temperatura en la zona central del horno. Para el tratamiento de piezas grandes en atmósfera de aire se utilizó un horno eléctrico tipo mufla PIROVAL con controlador digital de temperatura PIXSYS modelo 901. Las probetas se colocaron sobre placas de alúmina.

2.13. Molienda

La molienda de los materiales de partida se realizó en un molino planetario de ágata FRITSCH modelo Pulverisette con bolas de ágata de ~ 10 mm de diámetro.

2.14. Prensado

Los polvos fueron prensados uniaxialmente o isostáticamente en función de la forma y tamaño requeridos.

2.14.1. Prensado uniaxial

Se empleó esta técnica para la obtención de pastillas de 10mm de diámetro y un espesor aproximado de 2mm. La presión aplicada fue de 2-3 toneladas en una prensa Perkin Elmer. Para evitar la contaminación se utilizó un troquel de circona parcialmente estabilizada (Y-TZP) de ~ 10 mm de diámetro.

2.14.2. Prensado isostático en frío

Este método de compactación de polvos se basa en el principio de Pascal y consiste en la aplicación de una presión hidrostática mediante un fluido, en este caso aceite, que compacta los polvos uniformemente y en todas las direcciones. Mediante este proceso se compactaron esferas de ~ 10 mm de diámetro empleando una prensa ASTURSINTER y aplicando una presión de 200MPa. Los polvos se introdujeron en moldes de látex sellados en los extremos y se sumergieron en una cámara de prensado conteniendo aceite que se cierra herméticamente.

2.15. Pulido

La observación de las muestras al microscopio óptico y en ciertos casos a los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión requiere una etapa previa de pulido. Este proceso se describe a continuación:

A) Embutido de las muestras en una resina epoxy de fraguado a temperatura ambiente (Epofix Resin (EPOES) + Endurecedor (EPOAR)), que permite la manipulación de las muestras para el pulido.

B) Desbastado grueso con un disco de diamante de $65\mu\text{m}$ de tamaño de grano, seguido de un desbastado fino con un disco de diamante de $20\mu\text{m}$ de tamaño de grano, utilizando agua como lubricante en ambos desbastados.

C) Pulido propiamente dicho empleando una suspensión acuosa de ceria (CeO_2). El tiempo de pulido dependió de la dureza de la muestra.

2.16. Caracterización microestructural

A continuación se describen las diferentes técnicas de microscopía empleadas para la caracterización microestructural.

2.16.1. Microscopía óptica de luz reflejada

La microscopía óptica de luz reflejada permite observar la microestructura, las distintas fases presentes, su forma, tamaño, distribución y textura, así como la porosidad o posibles heterogeneidades del material. El microscopio utilizado fue el modelo LEICA DMRM con cuatro objetivos de distintos aumentos (5x, 10x, 20x y 50x), que tiene acoplada una cámara de vídeo para la captura digital de imágenes.

2.16.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El estudio del recubrimiento de vidrio conteniendo nanopartículas de plata sobre un sustrato de la aleación Ti-6Al-4V se desarrolló en un microscopio Hitachi S-4300 con un poder de resolución de 1,5nm a 15kV. Este microscopio posee un sistema de microanálisis por energías dispersadas de Rayos X, que permitió realizar microanálisis semicuantitativos de las fases o elementos presentes en los recubrimientos y un detector de electrones retrodispersados para evaluar la presencia y distribución de las nanopartículas de plata en la matriz vítrea. El resto de muestras se estudiaron en un microscopio FEI NOVA NANOSEM 230 con un poder de resolución de 1nm a 15kV, equipado con detector TLD y sistema de microanálisis por energías dispersadas de Rayos X.

2.16.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

El estudio morfológico de las muestras en polvo y de las muestras sinterizadas se llevó a cabo en dos microscopios distintos: un microscopio JEOL modelo JEM 2000 FXII trabajando a un voltaje de aceleración de los electrones de 200kV y con un poder de resolución de aproximadamente 3Å, y un microscopio JEOL modelo JEM 2100F para la obtención de micrografías en modo campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) con unas condiciones de trabajo de 200kV y una resolución puntual de 0,13nm. El estudio de las muestras biológicas requiere unas condiciones de operación diferentes ya que las células no resisten un voltaje de aceleración de los electrones superior a 100kV. Por ello, para su estudio se emplearon los microscopios STEM LEO 910 trabajando a 80kV y JEOL JEM-1011 a 100kV. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

Las muestras en polvo se dispersaron en un disolvente volátil (etanol) mediante ultrasonidos, para posteriormente depositar una gota de dichas suspensiones sobre una rejilla de cobre para microscopía electrónica. La

posterior evaporación del disolvente se realizó a temperatura ambiente. Las rejillas empleadas dependen del tipo de microscopía realizada y fueron suministradas por ANAME. Para el análisis por microscopía electrónica de transmisión (microscopio JEM 2000FXII), se usaron rejillas recubiertas en primer lugar por una fina capa de polímero y posteriormente por una fina capa de carbón depositado mediante evaporación (ANAME referencia: FCF300-Cu). En el caso de las muestras analizadas por HAADF las rejillas empleadas fueron similares a las anteriores pero con aberturas o huecos para evitar la interferencia de la capa de polímero y carbón en el análisis (ANAME referencia: LC325-Cu).

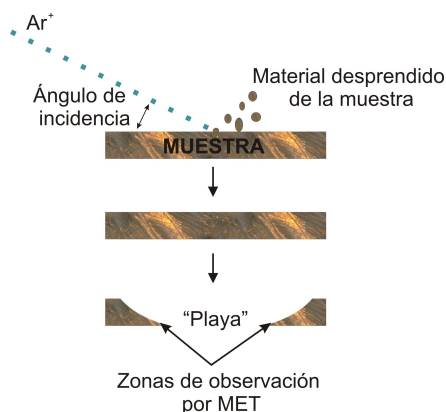


Figura 2.2: Esquema del proceso de adelgazamiento iónico.

Las muestras sinterizadas se pulieron previamente hasta alcanzar $80\mu m$, para ser sometidas después a adelgazamiento iónico en un adelgazador iónico FISCHIONE modelo 1010 donde fueron bombardeadas con iones de Ar^+ . Estos iones inciden con un ángulo y con un voltaje de aceleración determinados, hasta conseguir un orificio de dimensiones reducidas y en cuyas inmediaciones el espesor no supera los $10nm$ (denominado playa), con el objeto de ser transparente a los electrones. En la figura 2.2 se explica de manera esquemática el proceso de adelgazamiento iónico. El

proceso de desbastado se puede vigilar de manera visual mediante una lente binocular. Las rejillas empleadas fueron suministradas por ANAME (referencia: EA150-Cu), pero en este caso no poseen ni polímero ni capa de carbón.

Las muestras compuestas por polvo de vidrio y microorganismos fueron preparadas según se describe a continuación. Asimismo, en la figura 2.3 se ilustra el método de preparación.

A) En primer lugar, se preparó un cultivo con el microorganismo a estudiar sobre el que se añadieron 75 μ L de una suspensión acuosa, previamente esterilizada, del polvo de vidrio con las nanopartículas de plata o de cobre de tamaño inferior a 10 μ m, con el fin de poder observar los microorganismos sin interferencias por parte del vidrio, y una concentración de 200mg/mL, que es equivalente a la concentración utilizada en los ensayos biocidas.

B) Este cultivo de microorganismos se mantuvo durante 1h en contacto con el vidrio con las nanopartículas de plata o de cobre, en condiciones similares a las de un ensayo biocida. Paralelamente, sobre la rejilla de cobre para microscopía electrónica (ANAME FCF300-Cu) se realizó una descarga iónica en un equipo BALZERS Modelo 010, para poder fijar las bacterias a dicha rejilla.

C) Sobre la cara ionizada de la rejilla se depositó una gota de 10-15 μ L del cultivo que contenía los microorganismos con el polvo de vidrio, y se dejó incubar durante 2 minutos.

D) Transcurrido ese tiempo, la rejilla se bloteó, esto es, se puso la rejilla en posición vertical y se dejó caer el líquido que no había sido absorbido tras la incubación. Posteriormente, se lavó en tres gotas de agua mili-Q sin blotear de una gota a otra. Una vez lavada la rejilla en la última gota, se bloteó y se dejó secar a temperatura ambiente.

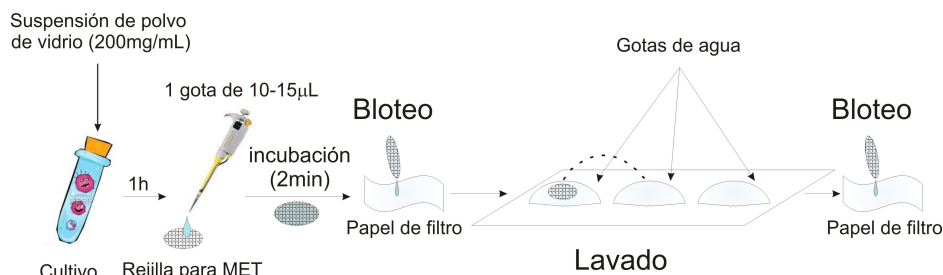


Figura 2.3: Esquema de preparación de muestras biológicas para su observación mediante MET.

2.17. Estudios de resistencia hidrolítica

La resistencia hidrolítica de los vidrios sodocálcicos fue evaluada mediante la pérdida de peso de las muestras de vidrio sin moler, de dimensiones 10x10x1mm³, método propuesto por Day et al.⁶ Dichas muestras fueron continuamente lavadas con agua destilada a ~90°C, usando para ello una columna de destilación *Soxhlet*.^{7,8}

2.18. Ensayos biocidas

Los estudios para evaluar la actividad biocida se desarrollaron sobre tres microorganismos diferentes: *Escherichia coli* JM 110 (bacteria gram-negativa), *Micrococcus luteus* (bacteria gram-positiva) e *Issatchenkia orientalis* ATCC 6258, también conocida como *Candida krusei*, que es una levadura. Se realizaron diferentes tipos de ensayos para determinar la actividad biocida en función del material biocida empleado. La preparación inicial de los microorganismos fue común para todos los ensayos y se describe en el siguiente apartado.

2.18.1. Preparación de los microorganismos

Se procedió a la siembra en medio sólido sobre placas Petri, partiendo de microorganismos almacenados a -80°C . Las placas Petri eran de 9cm de diámetro y contenían 20mL del nutriente llamado Luria Bertani (LB), cuya composición (%peso) es: triptona 1%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 1% y agar 1,5%. Estas placas fueron incubadas durante 18h a 36°C . Seguidamente, colonias aisladas de las placas anteriores se inocularon en 1mL del medio nutriente líquido correspondiente, y se cultivaron a 36°C durante 24h para obtener los cultivos saturados. Los medios nutrientes líquidos utilizados fueron: Luria Bertani (LB) para colonias bacterianas y Extracto de Levadura Peptona Glucosa (YEPD) para los cultivos de levaduras. La composición del medio líquido YEPD es la siguiente (%peso): extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 2%.

2.18.2. Cultivo en medio líquido

Este método se ha basado en la norma Internacional ASTM E 2149-01, la cual fue modificada siguiendo las indicaciones del Profesor F. Malpartida (departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CNB-CSIC). El nuevo método desarrollado se describe a continuación:

Tras la etapa de preparación de los microorganismos descrita en el apartado 2.18.1, en la que se obtuvieron los cultivos saturados, se tomaron $10\mu\text{L}$ de estos cultivos y se sembraron en 1mL de medio fresco (LB para bacterias o YEPD para levadura). Estos inóculos se mantuvieron a 36°C durante 6h para obtener precultivos con una densidad de entre 10^{10} a 10^{11} de colonias viables por mililitro de cultivo. A continuación, se tomaron $10\mu\text{L}$ de cada uno de los precultivos y se inocularon en 1mL de medio líquido fresco (LB o YEPD, según el microorganismo empleado). Seguidamente, se añadieron $75\mu\text{L}$ de las suspensiones acuosas de los materiales biocidas correspondientes, que fueron previamente

esterilizadas. La esterilización se llevó a cabo durante media hora en un autoclave a 125°C. Paralelamente, se prepararon cultivos de control, de manera que en lugar de adicionar la suspensión con el material biocida, se adicionó la cantidad equivalente (75μL) de agua mili-Q. Finalmente, los distintos cultivos se incubaron en agitación horizontal, realizando extracciones cada 24h con el fin de proceder a titular los microorganismos sobrevivientes mediante plaqueo, empleando para ello diluciones seriadas, en medio LB líquido, desde la dilución 10^{-1} hasta 10^{-9} .

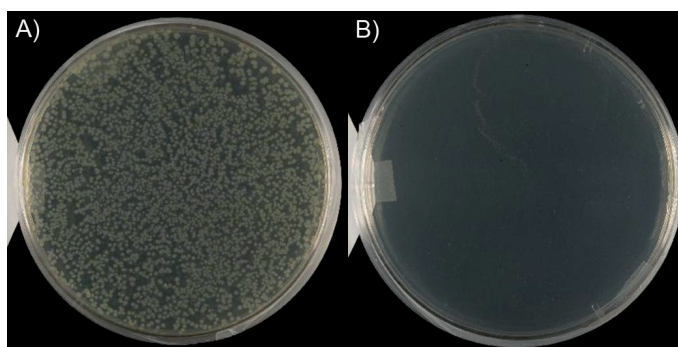


Figura 2.4: Placas Petri utilizadas para el conteo de UFC de *E. coli* tras 24h de incubación a 36°C. (A) cultivo control y (B) cultivo con agente biocida.

El plaqueo consistió en la deposición de 100μL de cada una de las diluciones seriadas anteriores sobre placas Petri que contienen una base de medio LB sólido, para asegurar el crecimiento de las colonias de los microorganismos. Cada microorganismo (o unidad formadora de colonia) se reproduce y da lugar a una única colonia, de manera que, transcurridas 24h de incubación en estufa a 36°C, es posible realizar un conteo visual de las colonias, y así determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cultivo. Cada ensayo fue repetido tres veces.

En la figura 2.4 se muestran dos ejemplos de las placas Petri utilizadas para el plaqueo y posterior conteo visual de colonias. En la figura 2.4A se muestra la placa Petri correspondiente a un plaqueo de la dilución 10^{-8} de un cultivo de control de *E. coli*, donde se puede observar un elevado número de colonias. En contraposición, en la figura 2.4B se muestra la placa Petri correspondiente a un plaqueo directo, es decir, sin diluir, de un cultivo de *E. coli* al que se añadió una suspensión acuosa de partículas de vidrio con nanopartículas de plata. En este caso no se observa el crecimiento de ninguna colonia.

2.18.3. Antibiógramas

Tradicionalmente los antibiógramas se han realizado para determinar la actividad biocida de los materiales mediante la observación de un halo de inhibición alrededor de la muestra^{9,10}, siguiendo las indicaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Este comité actualmente se conoce como *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Sobre un cultivo de microorganismos en una placa Petri se colocan los materiales cuya actividad biocida se quiere estudiar. Estos materiales difunden o lixivian compuestos biocidas, provocando la muerte de los microorganismos. Como consecuencia de ello, aparece una zona transparente que recibe el nombre de *halo de inhibición*, (figura 2.5).

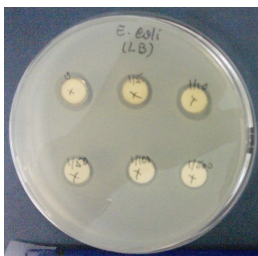


Figura 2.5: *Halo de inhibición* por lixiviación de materiales biocidas sobre *E. coli*.

Sin embargo, este método no permite cuantificar el número de microorganismos que mueren como consecuencia de la adición de agentes biocidas, y por tanto, no es posible determinar el poder biocida del material a estudiar. Para solventar este problema, se han introducido modificaciones en el método tradicional, siguiendo las indicaciones del profesor F. Malpartida.¹¹ El nuevo método consta de varias etapas y se detalla seguidamente:

Preparación de los antibiogramas: Se realizó una dilución 1/1000 de los cultivos saturados obtenidos en el apartado 2.18.1 y se tomaron 50 μ L de cada una de estas diluciones para añadirlos sobre 4mL de SNA fundido. El SNA (*Soft Nutrient Agar*) es un gel de cobertura que contiene 0,6% de agar y se prepara a partir de medio LB. Este gel se utiliza como nutriente para los microorganismos. De esta manera, el SNA conteniendo los microorganismos correspondientes en cada caso, se vertió sobre placas Petri que contenían una capa base de LB o YEPD sólidos, dependiendo del microorganismo utilizado. Una vez gelificado el SNA, se pusieron los recubrimientos biocidas en contacto con la capa formada por SNA y los microorganismos. También se realizaron antibiogramas de control, consistentes en la colocación de los substratos correspondientes, pero sin el recubrimiento biocida.

Conteo de colonias en los antibiogramas: Transcurridas 24h, se retiraron tanto los substratos recubiertos con material biocida como los utilizados como control. A continuación, con un capilar de vidrio (1mm de diámetro) se extrajeron muestras cilíndricas a lo largo de toda la sección transversal de las placas Petri, con el fin de recoger todas las capas depositadas sobre dichas placas, y poder asegurar de este modo la recogida de todos los microorganismos. Las muestras sólidas extraídas se suspendieron en 500 μ L de una disolución tampón de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Seguidamente, fueron introducidas en un baño de ultrasonidos (durante 2 minutos) y agitadas después en un vórtex (1 minuto). Esto se hizo para desprender el gel SNA que contiene en su interior los microorganismos, del medio sólido (LB o YEPD) utilizado como base en la placa Petri.

Posteriormente, se dejaron decantar durante 10 minutos (en hielo para evitar el crecimiento de los microorganismos) y se tomaron 110 μ L para la realización de diluciones seriadas. Las diluciones seriadas 10⁰, 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁵ se realizaron en LB líquido y sirvieron para proceder al conteo de los microorganismos sobrevivientes, mediante plaqueo en medio LB sólido (descrito en el apartado 2.18.2). Cada ensayo fue repetido tres veces. La disolución tampón de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) utilizada está compuesta por: 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,44g de NaHPO₄; 0,24g de KHHPO₄; 800mL de agua bidestilada, ajustada a pH=7,4 con HCl y finalmente aforada a 1L con agua destilada.

2.18.4. Estudios de biopelícula o *biofilm*

Materiales: Para el estudio de la formación de *biofilm* sobre los materiales a estudiar se emplearon: una cepa estándar de referencia, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, y dos aislados clínicos (CI-1 y CI-2) pertenecientes a una colección previa de patógenos periodontales (Maestre, REQ2007). Los medios de crecimiento o nutrientes empleados fueron los siguientes: Todd-Hewitt, suplementado con un 5% de extracto de levadura (Difco; BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) y 50mM de glucosa (Panreac, Barcelona, España), conocida como THY-glucosa.

Formación y crecimiento de biofilm:

Se crecieron colonias sobre placas de agar Columbia (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) que se suspendieron en caldo de THY-glucosa e incubaron durante 16-20h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂, hasta alcanzar una densidad entre (0,5-1)·10⁸ UFC/mL. La densidad fue medida por espectrometría UV-vis. Los materiales a estudiar consistieron en discos de la aleación de Ti-6Al-4V recubiertos con material biocida, o sin recubrir en el caso del control, y fueron introducidos en las placas de agar. A continuación 100 μ L del inóculo anterior fueron añadidos sobre 900 μ L (dilución 1:10) de THY-glucosa. Las placas fueron incubadas durante 24h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

Cuantificación del *biofilm*

Para la cuantificación del *biofilm* se emplearon dos métodos distintos: A) el método de cristal violeta y B) el método de recuento de viables. Estos dos métodos se describen a continuación:

A) Método del cristal violeta seguido por medidas de absorbancia.

Esta técnica se realizó para determinar la cantidad total de *biofilm*. Tras su incubación, los discos fueron cuidadosamente lavados tres veces con una solución salina para eliminar las células no adheridas. Para la fijación del *biofilm* se añadieron 300 μ L de metanol. Transcurridos 20 minutos los sobrenadantes fueron retirados y los discos se secaron al aire. Posteriormente, los *biofilm* fueron teñidos con 300 μ L de 1 % de solución de cristal violeta (Química Clínica Aplicada, Tarragona, España) e incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, el exceso de tinte fue eliminado mediante un lavado de las placas con agua destilada. El cristal violeta que había quedado adherido fue liberado añadiendo 200 μ L de etanol y la cantidad total de *biofilm* fue medida mediante densidad óptica en un espectrómetro a 570nm. La línea base fue corregida restando la media de los valores obtenidos para el cristal violeta adherido a los controles negativos (discos sin recubrimiento biocida). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

B) Recuento de viables

Este método se empleó para determinar el *biofilm* adherido. Establecido el *biofilm* los discos fueron cuidadosamente lavados tres veces con solución salina estéril para eliminar las células no adheridas, e insertados en tubos que contenían 5mL de solución salina estéril. Los tubos fueron agitados vigorosamente en un vórtex durante 2 minutos para liberar las bacterias adheridas sobre la superficie de los discos y sonicados durante 10 segundos para dispersar los microorganismos. Se tomaron muestras de 200 μ L de los *biofilm* sonicados y se diluyeron en 0,9 % de solución salina y plaqueadas sobre placas de agar Columbia para determinar el número total de células viables y poder expresarlas como UFC/mm². Todos los experimentos se

realizaron por triplicado. El límite de detección fue de $2,5 \cdot 10^2$ UFC. Estudios preliminares indicaron que la sonicación no afectaba a la viabilidad de las células.

2.19. Medidas de pH

Las medidas de pH se realizaron sobre los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos en medio líquido, una vez terminados los ensayos biocidas. Antes de la realización de las medidas de pH, todos los cultivos fueron centrifugados durante 5 minutos y posteriormente filtrados por debajo de $0,2 \mu\text{m}$ para eliminar los restos de células y las partículas en suspensión. También se midió el pH de suspensiones acuosas de diferentes polvos de vidrio bajo fuerza iónica constante (que se consiguió mediante la adición de KNO_3 10^{-2}M). El pH-metro utilizado fue un JENWAY modelo 3510.

2.20. Estudios de despolarización de membrana

Los análisis de despolarización de la membrana tanto para *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* se realizaron por medidas espectrofluorimétricas, utilizando como sonda el compuesto conocido como oxonol ($\text{DiBAC}_4(3)$), suministrado por Invitrogen S.A. y siguiendo un procedimiento previamente descrito en la literatura.¹² Para ello, los cultivos frescos preinoculados con un cultivo a saturación y crecidos durante 2h, se trataron con la correspondiente muestra de vidrio en presencia de oxonol. El cultivo fue observado al microscopio de fluorescencia tras estar una hora en contacto con el vidrio correspondiente. El microscopio empleado fue un Olympus equipado con filtro U-MNIB2. Las condiciones fueron: excitación a $\lambda=470\text{nm}$ y emisión a $\lambda=515\text{nm}$.

2.21. Estudios de lixiviación

Con el fin de determinar la cantidad de plata, cobre y calcio lixiviados, tanto de los polvos de vidrio, como de los recubrimientos, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

2.21.1. Lixiviación de cobre, plata y calcio de los polvos de vidrio durante los ensayos de cultivo en medio líquido

La cuantificación de cobre, plata y calcio lixiviados de los polvos de vidrio en el transcurso de los ensayos biocidas de cultivo en medio líquido (descritos en el apartado 2.18.2), se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica en un espectrómetro de emisión con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Para ello, tras 48h de ensayo biocida se centrifugaron los cultivos y los sobrenadantes resultantes se pasaron por un filtro de $0,2\mu\text{m}$ para eliminar los restos de microorganismos y el polvo de vidrio. La disolución acuosa obtenida fue disuelta en HNO_3 y analizada por ICP. El equipo utilizado fue un espectrómetro de emisión por Plasma ICP PERKIN ELMER modelo OPTIMA 2100 DV.

2.21.2. Lixiviación de cobre, plata y calcio de los recubrimientos durante los ensayos de antibiogramas

Transcurridas 24h de ensayo mediante antibiograma, según se describió en el apartado 2.18.3, se retiró el recubrimiento y se recogió la zona de agar que había quedado justo bajo el recubrimiento. A continuación, se congeló a -80°C durante 24h para lograr la fragmentación del agar, se colocó lana de vidrio a modo de filtro en el fondo de un vial eppendorf de 2mL con un pequeño orificio en el fondo y se añadió el agar previamente descongelado (figura 2.6). El eppendorf se introdujo en un tubo de vidrio de 10mL para

centrifugarlo (a 6000r.p.m. durante 15 minutos) y se obtuvo de esta manera un filtrado consistente en una disolución acuosa del cobre, calcio o plata lixiviados, según el caso. En la lana de vidrio quedaron retenidos el agar, los microorganismos y las partículas sólidas (de tamaño superior a $1\mu\text{m}$). Se realizaron 3 lavados con agua miliQ para extraer todo el material lixiviado. Finalmente, esta disolución acuosa fue analizada por ICP para determinar la concentración de cobre, plata y calcio.

El equipo utilizado fue un espectrómetro de emisión por Plasma ICP PERKIN ELMER modelo OPTIMA 2100 DV.

En la figura 2.6 se recogen las fotografías de la secuencia del proceso y de los materiales empleados. De esta manera, en las figuras 2.6A y 2.6B se muestran los viales eppendorf con la lana de vidrio y el agar en su interior. La figura 2.6C corresponde a las imágenes de los tubos falcon que contienen en su interior los viales eppendorf antes de centrifugarlos y, finalmente, la figura 2.6D muestra los tubos falcon tras la centrifugación, donde se observa cómo el líquido que contiene las nanopartículas ha sido extraído del agar.

2.21.3. Lixiviación de plata en agua desionizada de los polvos de vidrio-nAg empleados en los recubrimientos

El dispositivo fue montado de la siguiente manera: se colocó 1g de polvo de vidrio-nAg sobre papel de filtro, por el que se hizo caer a flujo constante agua desionizada a temperatura ambiente (25°C) y, tras pasar por el papel de filtro con el polvo de vidrio-nAg, se recogió en un bidón, del cual se fueron tomando alícuotas cada cierto tiempo. Finalmente, se analizó por ICP la cantidad de plata lixiviada.

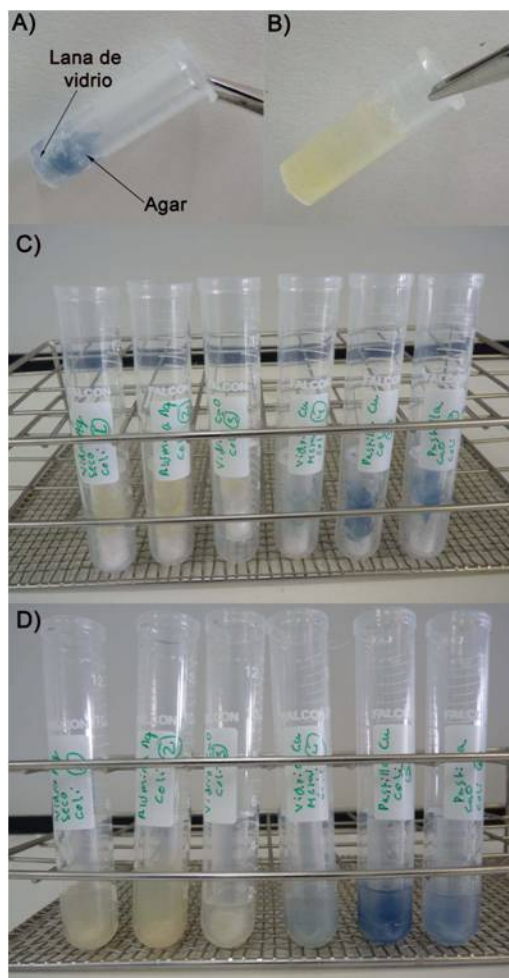


Figura 2.6: Fotografías de: (A) vial eppendorf con lana de vidrio en el fondo sobre la que se ha depositado agar con nanopartículas de cobre lixiviadas, (B) vial eppendorf con lana de vidrio en el fondo sobre la que se ha depositado agar con nanopartículas de plata lixiviadas, (C) tubos falcon con los viales eppendorf en su interior para recoger el líquido tras la centrifugación y (D) tubos falcon mostrando el líquido extraído tras la centrifugación.

2.22. Bibliografía

1. M Faraldos, C Goberna. Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2002.
2. MJ Pascual, L Pascual, A Duran. Determination of the viscosity-temperature curve for glasses on the basis of fixed viscosity points determined by hot stage microscopy. *Phys. Chem. Glasses* 2001;42(1):61-66.
3. G Elssner, H Hoven, G Kiessler, P Wellner. *Ceramics and Ceramic Composites: Materialographic Preparation*. New York: Elsevier; 1999.
4. DW Richerson. *Modern Ceramic Engineering*. New York: Marcel Dekker; 1992.
5. P Miranzo, JS Moya. Elastic/plastic indentation in ceramics: a fracture toughness determination method. *Ceram. Int.* 1984;10(4):147-152.
6. DE Day, Z Wu, CS Ray, P Hrma. Chemically durable iron phosphate glass wasteforms. *J. Non-Cryst. Solids* 1998;241(1):1-12.
7. A Silva, S Castanho. Silicate glasses obtained from fine silica powder modified with galvanic waste addition. *J. Non-Cryst. Solids* 2004;348:211-217.
8. AC Silva, S Mello-Castanho, F Guitian, I Montero et al. Incorporation of galvanic waste (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb) in a Soda-Lime-Borosilicate Glass. *J. Am. Ceram. Soc.* 2008;91(4):1300-1305.
9. A Oya, T Banse, F Ohashi, S Otani. An antimicrobial and antifungal agent derived from montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 1991;6(2):135-142.
10. JS Kim, E Kuk, KN Yu, JH Kim et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med* 2007;3:95-101.

11. L Esteban-Tejeda, F Malpartida, LA Díaz, R Torrecillas et al. Glass-(nAg, nCu) Biocide Coatings on Ceramic Oxide Substrates. PLoS ONE 2012;7(3):e33135.
12. J Seidl. Evaluation of membrane physiology following fluorescence activated or magnetic cell separation. Cytometry 1999;36(2):102-111.

Capítulo 3

Actividad biocida de materiales inorgánicos que contienen nAg

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción, existe una clara necesidad de desarrollar nuevos materiales inorgánicos con una elevada actividad biocida. Esto significa que, además de ser activos frente a un amplio espectro de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos o levaduras, deben proporcionar también una desinfección segura.

En este capítulo se plantean varios materiales inorgánicos en polvo como alternativa a los biocidas existentes. Estos materiales están compuestos por una matriz inorgánica en la que se han soportado o embebido, según el caso, nanopartículas metálicas de cobre o de plata. Como matrices inorgánicas se eligieron las tierras de diatomeas (rocas silíceas sedimentarias de origen fósil) y materiales arcillosos de origen mineral (caolín, metacaolín, montmorillonita y sepiolita), ya que son materias primas de bajo coste que se utilizan en diferentes procesos industriales (cerámica, papel, construcción, plástico, farmacia o alimentación) por lo que están altamente disponibles en el mercado (*commodities*).

A su vez, las diatomeas que están compuestas principalmente por sílice, y los materiales arcillosos elegidos poseen una composición química fundamentalmente basada en sílice, alúmina y magnesia. Todos estos óxidos se integran fácilmente en una red vítrea, que es el principal objetivo de este trabajo de tesis.

Finalmente se estudió también un material sintético como es el hidroxiapatito por su extraordinaria importancia en el campo de los biomateriales.¹

3.1. Materiales de partida

3.1.1. Diatomeas

Las diatomeas son algas unicelulares eucariotas que forman parte del plancton marino pudiendo formar cadenas o grupos de varias células. Están dotadas de un pigmento llamado diatolina, lo que confiere a sus cromatóforos (células con pigmentos que reflejan la luz), un color amarillo, verde oliva o pardo.² Una de sus principales características es su pared celular consistente en un caparazón de sílice. Este caparazón presenta una estructura a escala nanométrica con una compleja trama de canales y poros que es específica para cada especie de diatomea. Esta red de canales y poros permiten a la diatomea comunicarse con el medio acuático para tomar de él las sustancias necesarias para su alimentación y respiración y para liberar los desechos. A su vez, el espesor de este caparazón varía entre 10 y 200 μm y está adaptado para que las diatomeas puedan flotar. En la figura 3.1 se muestran algunos ejemplos de caparazones de diferentes especies de diatomeas.

Al morir las diatomeas su caparazón se fue depositando en el fondo de los antiguos océanos y con el paso de las diferentes eras se fueron acumulando formando depósitos, llegando en ocasiones a alcanzar espesores de miles

de metros. Finalmente, los caparazones se fosilizaron y comprimieron creando rocas sedimentarias llamadas tierras de diatomeas. Estas tierras de diatomeas poseen numerosas aplicaciones, debido principalmente a que son un material abundante y económico. Por ejemplo se utilizan para la fabricación de vidrio, dinamita, cerillas, cementos para usos especiales, polvos pulidores, como materia prima para filtros de agua y en la industria farmacéutica.^{3,4}

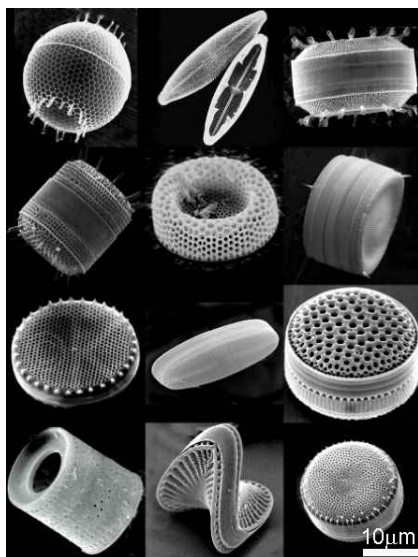


Figura 3.1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando los caparazones de diferentes especies de diatomeas.

3.1.2. Caolín

El caolín se introdujo a comienzos del siglo XIX en la industria textil y papelera, después fue utilizado en la fabricación de porcelanas y refractarios. Actualmente tiene una gran variedad de usos y aplicaciones

en esmaltes, tintas, tejidos, curtidos, jabones, cosméticos, fibra de vidrio o pesticidas, debido a sus propiedades entre las que destacan: su bajo coste, alta disponibilidad, blancura, ausencia de toxicidad, resistencia mecánica tras la cocción, alta refractariedad, elevada superficie específica, capacidades absorbentes y adherentes, suspensiones de altas concentraciones en sólidos y baja viscosidad⁵.

El término caolín se emplea para designar productos compuestos principalmente por caolinita, mineral del grupo de la arcilla cuya composición es: $2\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La caolinita tiene una estructura laminar, formada por una capa de tetraedros de sílice y otra capa de octaedros de alúmina, combinadas de tal manera que los vértices libres de los tetraedros de sílice están en uno de los planos aniónicos de los octaedros, según se muestra en la figura 3.2.

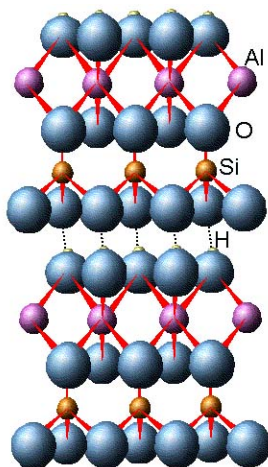


Figura 3.2: Representación esquemática de la estructura de la caolinita.

En el plano común a tetraedros y octaedros, los $2/3$ de los huecos están

ocupados por oxígenos y el resto por oxidrilos. Por otra parte, la capa octaédrica posee $2/3$ de los huecos ocupados por aluminios distribuidos hexagonalmente en coordinación octaédrica en el centro de la capa. Ambas capas forman una lámina de $7,14\text{\AA}$ de espesor y debido a que tiene únicamente $2/3$ de las posiciones octaédricas ocupadas dejando el tercio restante vacante, la lámina recibe el nombre de dioctaédrica. A su vez, estas láminas se unen mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos OH^- de la capa octaédrica y los átomos de oxígeno de la capa tetraédrica.^{6,7}

3.1.3. Metacaolín

El metacaolín fue obtenido mediante la deshidroxilación del caolín. Para ello, fue necesario un tratamiento térmico a 700°C durante 24h en atmósfera de aire. Al calcinar el caolín por encima de 400°C tiene lugar una deshidroxilación progresiva con la consiguiente pérdida de dos moléculas de agua por fórmula estructural y la reducción del número de aniones unidos al Al^{3+} . Como resultado, se obtiene una estructura diferente en la que el aluminio está pentacoordinado, según se muestra en la figura 3.3. En esta figura puede observarse la estructura del metacaolín donde dos aluminios comparten los dos oxígenos pertenecientes a dos grupos OH (O_3 y O_4) y cada aluminio está coordinado con otros tres oxígenos tetraédricos, dos oxígenos apicales (O_1 y O_2) y un oxígeno de la capa adyacente (O_5). Al calcinar el metacaolín por encima de 600°C hasta 900°C , la coordinación del silicio cambia, como consecuencia de la ruptura de la lámina tetraédrica, produciéndose la subsecuente segregación de sílice amorfa. Sin embargo, esto no afecta a la coordinación del aluminio. Por el contrario si el metacaolín es calcinado a 980°C durante 3h, el aluminio deja de estar pentacoordinado para pasar a estar hexacoordinado, ya que es su coordinación más estable. Este cambio en la coordinación del aluminio también puede obtenerse mediante una calcinación a más baja temperatura (880°C) durante 36h.⁸

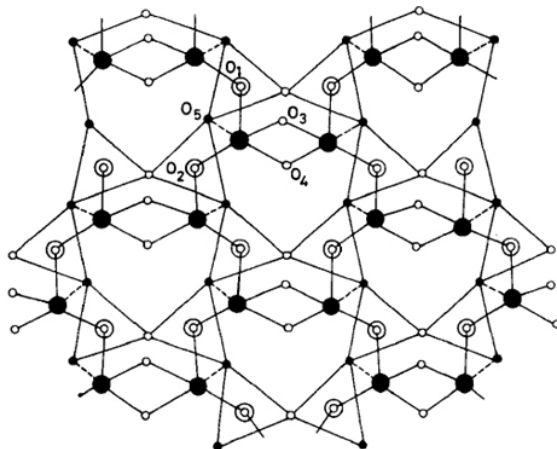


Figura 3.3: Representación esquemática de la estructura del metacaolín. Los símbolos corresponden a: (○) Silicio, (●) Aluminio, (○) Oxígeno y (●) Oxígeno de la capa adyacente (O_5).

El metacaolín tiene especial interés debido a que puede usarse como precursor en la síntesis de geopolímeros (aluminosilicatos inorgánicos), área emergente dentro de la ciencia de los materiales debido a sus múltiples aplicaciones en la construcción, arquitectura e ingeniería. La versatilidad de estos materiales les ha convertido en los principales sustitutos de los cementos portland, también se emplean en la reparación y restauración de estructuras arqueológicas, en la fabricación de los aviones modernos por su resistencia al fuego y como precursores para la síntesis de cerámicas monolíticas.^{9,12}

3.1.4. Montmorillonita

La montmorillonita es el mineral de la arcilla dominante en la bentonita, que es una ceniza volcánica alterada. La característica más destacada es su capacidad para la absorción de agua entre sus láminas, lo que produce

una marcada dilatación de su estructura pudiendo variar la distancia interlaminar desde $9,64\text{\AA}$ (donde se ha extraído todo el agua) hasta $21,4\text{\AA}$ (caso de máxima absorción de agua). Esta característica da lugar a interesantes usos industriales, siendo el más importante el uso como barro de perforadora, utilizándose la montmorillonita para dar al fluido una viscosidad varias veces superior a la del agua. También se emplea para taponar escapes en suelos, rocas y diques.

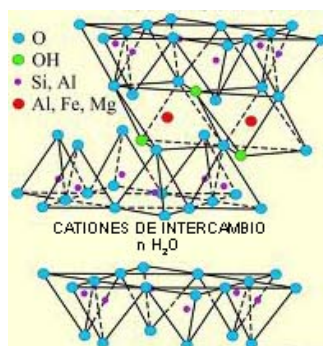


Figura 3.4: Estructura laminar de la montmorillonita.

La montmorillonita es trilaminar del tipo TOT, ya que está compuesta por una capa octaédrica comprendida entre dos capas tetraédricas y es del tipo dioctaédrico, lo que significa que $2/3$ de las posiciones octaédricas están ocupadas y el tercio restante está vacante. En la montmorillonita parte del aluminio puede estar sustituido por hierro o magnesio, y parte del silicio por aluminio (figura 3.4). La composición real de las láminas de montmorillonita es variable, aunque parecida a la siguiente: $(\text{Mg}_{0,2}\text{Al}_{1,8})(\text{Al}_{0,1}\text{Si}_{3,9})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. La sustitución de cationes da lugar a una deficiencia de cargas positivas en la estructura, de manera que las láminas tienen una carga neta negativa. Gracias a esta deficiencia de cargas positivas la montmorillonita tiene capacidad para atraer cationes Ca^{2+} hacia su superficie, aunque es lo bastante débil como para permitir

que otros cationes sustituyan a los primeros mediante un proceso de intercambio. Estos cationes son llamados cationes de intercambio.^{13,14} La estructura de la montmorillonita se muestra en la figura 3.4 donde se observa la capa octaédrica entre las dos capas tetraédricas, así como el espacio interlaminar y la siguiente capa tetraédrica.

3.1.5. Sepiolita

La sepiolita es un mineral de la arcilla perteneciente al grupo de los filosilicatos pseudolaminares. Es un silicato magnésico hidratado de composición química $\text{Si}_{12}\text{Mg}_8\text{O}_{30}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ y cuya estructura corresponde a un ordenamiento de capas tipo talco, separadas por canales paralelos,¹⁵ según se muestra en la figura 3.5. A diferencia de las estructuras laminares que presentan otras arcillas como la bentonita, caolinita o el talco, la estructura de la sepiolita da lugar a partículas aciculares que contienen canales abiertos de dimensiones $3,6\text{\AA} \times 10,6\text{\AA}$ a lo largo de los ejes de la partícula. Por otra parte, la capacidad de intercambio iónico de la sepiolita es muy reducida, pero presenta una elevada superficie específica ($300\text{m}^2/\text{g}$), al contrario que la mayoría de los filosilicatos.

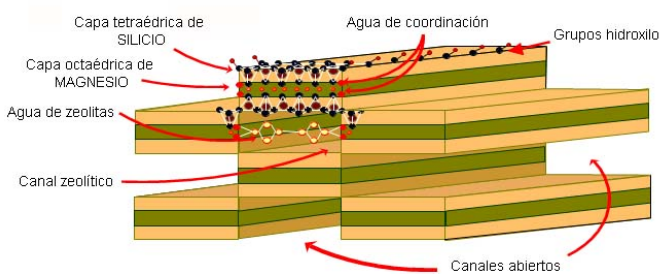


Figura 3.5: Estructura de la sepiolita.

La sepiolita se ha utilizado principalmente como absorbente, sobre todo para camas de gatos, aunque actualmente se está empezando a comercializar con otros usos como aditivo en la comida de animales, portador de insecticidas y herbicidas, agente decolorante, para el refinamiento de aceite, en el tratamiento de aguas residuales, eliminación de olores y en la industria del papel.^{16,18}

Las características estructurales de la sepiolita y su elevada superficie específica la convierten en una matriz idónea para la obtención de nanopartículas metálicas monodispersas (Ni, Fe, Cu, Au, Ag, Co), evitándose los problemas de coalescencia y oxidación que presentan las nanopartículas metálicas en general y los problemas de salud derivados de su manipulación.¹⁹ Este extremo ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo de investigación del ICMM y ha dado lugar a múltiples publicaciones²⁰ y a dos tesis doctorales previas.^{17,21}

3.1.6. Hidroxiapatito

El hidroxiapatito es un mineral perteneciente a la familia de los ortofosfatos de calcio cuya fórmula es $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, pero suele representarse como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para indicar que la celda unidad del cristal comprende dos moléculas. En su estado puro presenta un color blanco y estructura cristalina, aunque en la naturaleza suele aparecer coloreado debido a impurezas (hierro y tierras raras principalmente). En 1926 DeJong determinó que el hidroxiapatito era el componente principal de los huesos y actualmente es considerado un biomaterial bioactivo y osteoconductor, es decir, es un material tolerado por el organismo que además de formar un enlace directo con el hueso receptor permite la formación de hueso sirviendo como “plantilla”.²² Esto hace que tenga numerosas aplicaciones en ortopedia, injertos óseos o implantes dentales.¹

El hidroxiapatito puro cristaliza en forma monoclinica con el grupo espacial $\text{P2}_1/\text{b}$ y con los parámetros de red: $a=9,4320$; $b=2a$; $c=6,8810\text{\AA}$;

$\gamma=120^\circ$.²³ Desde el punto de vista termodinámico esta es su forma más estable,²⁴ sin embargo, si se calienta por encima de 250°C sufre una transformación de fase de monoclinica a hexagonal con el grupo espacial $P6_3/m$.²⁵ Esta forma hexagonal es la más común y la implicada en la formación de huesos. Esto se debe a que la estructura hexagonal permite más fácilmente el intercambio de grupos OH^- con otros aniones como F^- , Cl^- y CO_3^{2-} . La representación esquemática de la estructura del hidroxiapatito en su forma hexagonal a lo largo del eje $[001]$ se muestra en la figura 3.6.

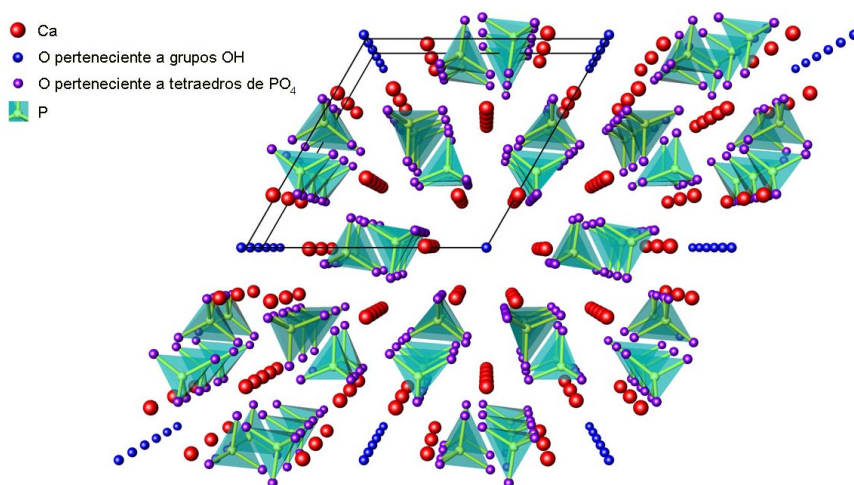


Figura 3.6: Representación esquemática de la estructura del hidroxiapatito en su forma hexagonal a lo largo del eje $[001]$ y con el grupo espacial $P6_3/m$.

3.2. Obtención de nanopartículas de plata soportadas y/o embebidas en matrices inorgánicas

Los materiales nanoestructurados se desarrollaron siguiendo distintos procedimientos que se detallan a continuación. La obtención de caolín, metacaolín, diatomeas e hidroxiapatito con nanopartículas metálicas de plata soportadas se realizó en colaboración con el Instituto Tecnológico de Materiales de Asturias (ITMA), empleando nitrato de plata (AgNO_3) como precursor de nanopartículas para posteriormente reducir químicamente los cationes Ag^+ con borohidruro de sodio (NaBH_4). El caolín-nAg y metacaolín-nAg se obtuvieron siguiendo el método descrito por B. Cabal et. al.²⁶ A su vez, las diatomeas-nAg y el hidroxiapatito-nAg, se elaboraron siguiendo el método descrito por M. Suárez et al.²⁷ y M. Miranda²⁸ et al., respectivamente. El contenido en plata fue en todos los casos del 1 % (peso).

Por otra parte, la montmorillonita con nanopartículas de plata soportadas (27,8% en peso de Ag) fue suministrada por Argenol S. L.

Finalmente, en el caso de la sepiolita, gracias a sus características estructurales particulares, además de nanopartículas soportadas, se obtuvieron elevadas cantidades de nanopartículas metálicas de plata embebidas en el interior de sus canales. La síntesis de la sepiolita-nAg (26% en peso de Ag) fue desarrollada inicialmente en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM)²⁰ y actualmente este producto es comercializado por el grupo TOLSA S. A.

3.3. Estudio de la actividad biocida

Los materiales inorgánicos descritos anteriormente pueden presentar una elevada actividad bactericida y fungicida debido a las propiedades

biocidas de la plata.^{29–33} Por ello, se realizó un estudio de su actividad biocida mediante cultivo en medio líquido. Este método de cultivo está detallado en el apartado 2.18 del capítulo 2. Los microorganismos estudiados fueron: *Escherichia coli* JM110 (bacteria gram-negativa), *Micrococcus luteus* (bacteria gram-positiva) e *Issatchenkia orientalis* que es una levadura de la colección ATCC 6258, también conocida como *Candida krusei*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La reducción logarítmica en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cultivo se calculó según la ecuación 3.1:

$$\text{Reducción logarítmica} = \log A - \log B \quad (3.1)$$

Donde A es el número de UFC/mL en el cultivo control después de 48h y B es el número de UFC/mL en el cultivo que contiene al agente biocida transcurridas 48h.

La concentración de plata en los cultivos que contenían los materiales a estudiar fue de 360ppm, a excepción del hidroxiapatito-nAg en cuyo caso una concentración de 260ppm ya produjo una elevada reducción en la población de microorganismos. La reducción logarítmica obtenida para todos los materiales frente a las bacterias (*E. coli* y *M. luteus*) fue en todos los casos superior a 4 (figura 3.7), lo que se considera una desinfección segura, según la regulación nacional sobre agua potable de La Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) y que está disponible en la página web siguiente que corresponde al código federal de regulaciones: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.³⁴ Sin embargo, en el caso de la levadura *I. orientalis*, el hidroxiapatito-nAg es el único material de entre todos los estudiados que produce una desinfección segura, presentando además una elevada actividad (reducción logarítmica >6), según se muestra en la figura 3.7.

También se realizó un análisis químico de los sobrenadantes obtenidos tras los ensayos biocidas mediante espectroscopia de absorción atómica

(ICP-OES), según se describió en el apartado 2.21.1 del capítulo de materiales y métodos, para determinar la cantidad de plata lixiviada al medio de cultivo. Según se muestra en la tabla 3.2 el hidroxiapatito lixivia únicamente 1,61ppm de plata en el cultivo con *I. orientalis*, mucho menos que el resto de materiales, (a excepción del caolín) y sin embargo, es el único que presenta una buena actividad biocida. Esto parece indicar que el hidroxiapatito-nAg debe contener otro elemento aparte de la plata que fomenta su extraordinaria actividad biocida. Teniendo en cuenta la composición química de los diferentes polvos utilizados (tabla 3.1), la diferencia más sobresaliente de todos ellos es el elevado contenido en fósforo y calcio del hidroxiapatito. El fósforo es un nutriente por tanto no se puede considerar como biocida. En consecuencia, queda claramente el ión Ca^{2+} como único posible responsable del incremento observado en la actividad biocida del polvo de hidroxiapatito-nAg. Este resultado es particularmente relevante dado que la matriz vítrea elegida en nuestro estudio es un vidrio sodocálcico con un notable contenido en CaO ($\sim 7\%$). En este sentido se ha realizado una extensa revisión bibliográfica y se ha podido constatar que varios autores describen al calcio como un material bacteriostático o fungiestático, ya que interfiere en la actividad enzimática de los microorganismos e inhibe su crecimiento,^{35–39} de manera que se puede inferir claramente que existe un efecto combinado, es decir, un sinergismo, entre el calcio lixiviado por el hidroxiapatito y el efecto biocida de la plata. La existencia de efectos sinérgicos entre diversos agentes químicos con efecto biocida ha sido ampliamente estudiada,^{40–42} Por ejemplo, Harrison et al. observaron que la combinación de cobre y cationes de amonio cuaternarios (NH_4^+) provoca un incremento en la actividad bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa*.⁴³ Por otro lado Potara et al.⁴⁴ han desarrollado un nuevo biocompuesto depositando sobre el polímero de quitosano nanopartículas de plata, las cuales actúan sinérgicamente con el quitosano, incrementando de esta manera su actividad bactericida.

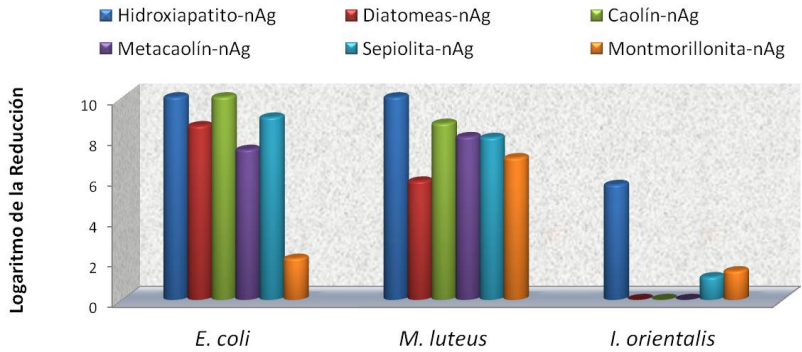


Figura 3.7: Logaritmos de la reducción frente a *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis* tras 48h de ensayo biocida.

	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	P ₂ O ₅	Ag
Caolín-nAg	54,3	0,03	0,02	0,37	0,67	33,0	-	1,0
Montmorillonita-nAg	33,9	-	-	0,064	0,87	25,0	0,04	28,0
Sepiolita-nAg	47,91	0,06	2,63	18,04	3,08	1,11	-	25,91
Diatomeas-nAg	90,5	-	-	-	-	4,2	-	1,0
Hidroxiapatito-nAg	-	33,4	-	-	-	-	65,6	1,0

Tabla 3.1: Análisis químico (%peso).

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	Ag (ppm)		
Caolín-nAg	2,27	2,81	0,56
Montmorillonita-nAg	6,31	3,36	5,17
Sepiolita-nAg	6,68	6,66	24,18
Diatomeas-nAg	9,32	11,55	2,24
Hidroxiapatito-nAg	1,18	1,34	1,61

Tabla 3.2: Ag(ppm) en los sobrenadantes de los cultivos tras 48h de ensayo.

3.4. Bibliografía

1. CS Chai, B Ben-Nissan. Bioactive nanocrystalline sol-gel hydroxyapatite coatings. J. Mater. Sci. - Mater. Med. 1999;10(8):465-469.
2. G Cognetti, M Sará, G Magazzu. Biología Marina. Bologna: Calderini della Calderini; 2001.
3. JL Cienfuentes, P Torres-García, M Frias. El Océano y sus Recursos V. Plancton. Méjico: Fondo de Cultura Económica; 2003.
4. V García. Introducción a la Microbiología. Costa Rica: EUNED, Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2004.
5. JF Bartolomé. El Caolín: Composición, estructura, génesis y aplicaciones. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio 1997;36:7-19.
6. RE Grim. Clay Mineralogy. New York: Mc Graw Hill; 1968. 285-341 p.
7. WD Kingery, HK Bowen, DR Uhlmann. Introduction to Ceramics. New York: John Wiley & Sons; 1976.
8. J Sanz, A Madani, JM Serratos, JS Moya et al. Aluminum-27 and Silicon-29 Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Study of the Kaolinite-Mullite Transformation. J. Am. Ceram. Soc. 1988;71(10):C418-C421.
9. JL Bell, PE Driemeyer, WM Kriven. Formation of Ceramics from Metakaolin-Based Geopolymers: Part I: Cs-Based Geopolymer. J. Am. Ceram. Soc. 2009;92(1):1-8.
10. JL Bell, PE Driemeyer, WM Kriven. Formation of Ceramics from Metakaolin-Based Geopolymers. Part II: K-Based Geopolymer. J. Am. Ceram. Soc. 2009;92(3):607-615.

11. J Davidovits. Geopolymer, Chemistry and Applications. Saint Quentin: Institut Géopolymère; 2008.
12. S Kumar. Geopolymers: New Generation Materials by Mimicking Rock Formation. SciTopics; 2011.
13. LM Thompson, FR Troeh. Los Suelos y su Fertilidad. Barcelona: Reverté; 2002.
14. C Klein, CS Hurlbut. Manual de Mineralogía. Barcelona: Reverté; 1997.
15. K Brauner, A Preisinger. Struktur und Entstehung des Sepioliths. Tscher. Miner. Petrog. 1956;6(1):120-140.
16. M Alkan, G Tekin, H Namli. FTIR and zeta potential measurements of sepiolite treated with some organosilanes. Microporous Mesoporous Mater. 2005;84(1-3):75-83.
17. A Esteban-Cubillo. Obtención de nanopartículas metálicas soportadas o embebidas en matrices oxídicas: alúmina-sepiolita. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2007.
18. M Kara, H Yuzer, E Sabah, MS Celik. Adsorption of cobalt from aqueous solutions onto sepiolite. Water Res. 2003;37(1):224-232.
19. A Esteban-Cubillo, R Pina-Zapardiel, JS Moya, MF Barba et al. The role of magnesium on the stability of crystalline sepiolite structure. J. Eur. Ceram. Soc. 2008;28(9):1763-1768.
20. C Pecharromán, A Esteban-Cubillo, I Montero, JS Moya et al. Monodisperse and corrosion-resistant metallic nanoparticles embedded into sepiolite particles for optical and magnetic applications. J. Am. Ceram. Soc. 2006;89(10):3043-3049.
21. R Pina-Zapardiel. Obtención de nanopartículas oxídicas, metálicas Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011.

22. MI Sánchez. An efficient approach to the synthesis of a calcium phosphate bone-cement and its reinforcement by hydroxyapatite crystals of various particle morphologies. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2008.
23. JC Elliott. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier; 1994.
24. M Corno, C Busco, B Civalieri, P Ugliengo. Periodic ab initio study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Phys. Chem. Chem. Phys. 2006;8(21):2464-2472.
25. SV Dorozhkin. Calcium orthophosphates. J. Mater. Res. Sci. 2007;42(4):1061-1095.
26. B Cabal, R Torrecillas, F Malpartida, JS Moya. Heterogeneous precipitation of silver nanoparticles on kaolinite plates. Nanotechnology 2010;21(47).
27. M Suárez, L Esteban-Tejeda, F Malpartida, A Fernández et al. Biocide activity of diatom-silver nanocomposite. Mater. Lett. 2010;64(19):2122-2125.
28. M Miranda, A Fernández, M Díaz, L Esteban-Tejeda et al. Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericidal and fungicidal materials. Int. J. Mater. Res. 2010;101(1):122-127.
29. JL Elechiguerra, JL Burt, JR Morones, A Camacho et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. J. Nanobiotechnol. 2005;3.
30. VS Kumar, BM Nagaraja, V Shashikala, AH Padmasri et al. Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. J. Mol. Catal. A: Chem. 2004;223(1-2):313-319.
31. YSE Lin, RD Vidic, JE Stout, VL Yu. Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of *Legionella pneumophila*. Water Res. 1996;30(8):1905-1913.

32. CN Lok. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J. Proteome Res. 2006;5(4):916-924.
33. C Marambio-Jones, E Hoek. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nanopart. Res. 2010;12(5):1531-1551.
34. USEPA (EPA). National Primary Drinking Water Regulations.
35. S Droby, ME Wisniewski, L Cohen, B Weiss et al. Influence of CaCl_2 on *Penicillium digitatum*, Grapefruit Peel Tissue, and Biocontrol Activity o *Pichia guilliermondii*. Phytopathology 1997;87(3):310-315.
36. AR Holmes, RD Cannon, MG Shepherd. Effect of calcium ion uptake on *Candida albicans* morphology. FEMS Microbiology Letters 1991;77(2-3):187-194.
37. M Zotti, A Ferroni, P Calvini. Inhibition Properties of Simple Fungistatic Compounds on Fungi Isolated from Foxing Spots. Restaurator 2007;28(3):201-217.
38. J Bautista-Gallego, FN Arroyo-López, MC Durán-Quintana, A Garrido-Fernández. Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. J. Food Prot. 2008;71(7):1412-1421.
39. CO Chardonnet, CE Sams, WS Conway. Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*. Phytochem. 1999;52(6):967-973.
40. JH Hsieh, CC Chang, C Li, SJ Liu et al. Effects of Ag contents on antibacterial behaviors of TaON-Ag nanocomposite thin films. Surf. Coat. Tech. 2010;205(Supplement 1):S337-S340.

41. J Song, H Kong, J Jang. Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. *Colloid Surface B* 2011;82(2):651-656.
42. S Sun, Q An, X Li, L Qian et al. Synergistic effects of chitosan-guanidine complexes on enhancing antimicrobial activity and wet-strength of paper. *Bioresource Technol.* 2010;101(14):5693-5700.
43. JJ Harrison, RJ Turner, DA Joo, MA Stan et al. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(8):2870-2881.
44. M Potara, E Jakab, A Damert, O Popescu et al. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* 2011;22(13):art. no. 135101.

Capítulo 4

Actividad biocida de un vidrio sodocálcico en polvo que contiene nAg o nCu

En el capítulo anterior se estudió la actividad biocida de varios materiales inorgánicos que contenían nanopartículas de plata. Sin embargo, las características que poseen cada uno de estos materiales son muy distintas entre sí, ya que tienen diferentes tamaños de partícula, morfología, superficies específicas, puntos isoeléctricos, etc., lo que hace que la lixiviación de la plata sea muy diferente y, por tanto, es difícil realizar un estudio comparativo entre ellos.

Por otra parte, los materiales estudiados en el capítulo 3 presentan problemas de tipo reológico (estructuras fibrosas, laminares, etc.) lo que dificulta su manipulación y la obtención de suspensiones estables. Con el objeto de obtener un sistema más homogéneo para estudiar la actividad biocida de manera comparable e independiente de las propiedades específicas de cada material, se procedió a introducir materiales que contengan nanopartículas de plata o de cobre en el seno de una matriz vítrea. Con ello se consigue homogeneidad morfológica y estructural, y la

posibilidad de controlar el proceso de lixiviación de la plata y del cobre.

Además, en el capítulo anterior se observó que el único material activo frente a la levadura fue el hidroxiapatito, que contenía calcio en su composición, y se analizó la posibilidad de la existencia de un efecto sinérgico entre el calcio y la plata que incrementa la actividad biocida. Por ello, para comprobar el posible efecto sinérgico, el vidrio elegido como matriz para embeber las nanopartículas con acción biocida (plata o cobre) fue un vidrio sodocálcico con una composición química próxima al vidrio de botella, pero con una temperatura de fusión menor.

4.1. Caracterización de los materiales de partida

Como matriz se empleó un vidrio comercial sodocálcico de bajo punto de fusión ($<1200^{\circ}\text{C}$), suministrado por Cristalerías Mataró S. L. Este vidrio pertenece al sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-B}_2\text{O}_3$ cuya composición, que aparece representada en el diagrama de equilibrio $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ (figura 4.1), es la siguiente (%peso): 70,2 de SiO_2 ; 15,8 de Na_2O ; 7,10 de CaO ; 3,20 de MgO ; 1,06 de B_2O_3 ; 1,71 de Al_2O_3 y 0,05 K_2O .

El motivo de emplear un vidrio de bajo punto de fusión es doble, por una parte, al ser sodocálcico contiene una notable cantidad de calcio, lo que le convierte en un material susceptible de crear un efecto sinérgico con las nanopartículas de cobre y de plata. Por otro lado, al tener bajos puntos de fusión y de deformación (reblandecimiento), es posible incorporar las nanopartículas a la matriz vítrea a menor temperatura ($\sim 725^{\circ}\text{C}$), evitando de esta manera tanto la fusión de dichas nanopartículas como su aglomeración, lo cual les restaría poder biocida. Esta disminución en los puntos de fusión y de deformación del vidrio se consigue añadiendo a la sílice óxidos modificadores de red (óxidos alcalinos y alcalinotérreos), según se explicó en el capítulo 1, y también mediante la adición del óxido formador B_2O_3 .

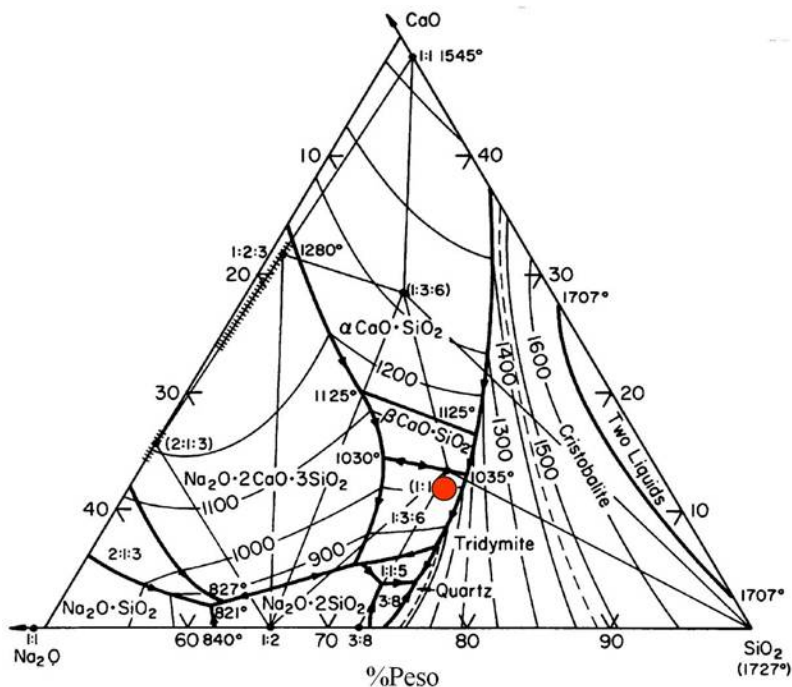


Figura 4.1: Sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ mostrando la localización del vidrio sodocálcico comercial.¹

Las fuentes de nanopartículas utilizadas fueron las siguientes: sepiolita-nAg, actualmente comercializada por el grupo TOLSA S.A. cuya síntesis y estructura se describen en el capítulo 3, la sepiolita-nCu, de síntesis y estructura similar a la sepiolita-nAg, actualmente comercializada también por TOLSA S.A. y por último el vitelinato-nAg, producto comercial suministrado por ARGENOL S. L.

El vitelinato está compuesto por caseína, una proteína de elevado peso molecular presente en gran cantidad en la leche de vaca (el 85 % de las

proteínas de la leche de vaca son caseína).² La estructura terciaria de la α_{s1} -caseína se muestra en la figura 4.2 a modo de ejemplo.

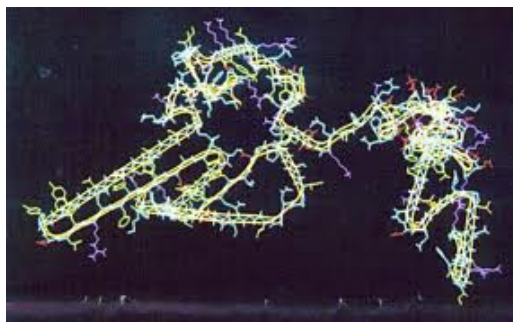


Figura 4.2: Estructura de la α_{s1} -caseína.

El motivo de la elección de estos materiales como fuente de nanopartículas se basó principalmente en la importancia de obtener cobre metálico monodisperso en la matriz vítrea, de manera que para preservar el cobre de su oxidación se embebe en la sepiolita, según fue estudiado anteriormente por C. Pecharromán et al.³ A su vez, el vitelinato-nAg fue seleccionado para la fabricación de los recubrimientos con vidrio-nAg sobre la aleación Ti-6Al-4V, que se desarrollarán en el capítulo 6. El vitelinato-nAg al ser un material orgánico, puede calcinarse casi completamente lo que permite incorporar una elevada cantidad de nanopartículas de plata al vidrio sin modificar substancialmente su composición (como ocurriría si se utilizara sepiolita-nAg) y, por tanto, sin necesidad de incrementar el punto de fusión del vidrio. Esto es importante ya que a temperaturas superiores a 1200°C se produce la fragilización de la aleación Ti-6Al-4V y pierde sus propiedades mecánicas.

4.1.1. Análisis químico

En las siguientes tablas se recogen los análisis químicos (%peso) correspondientes a los materiales de partida utilizados.

Vidrio (Cristalerías Mataró S. L.)								
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂
70,2	7,1	15,8	3,2	0,05	1,71	1,06	0,02	0,001

Tabla 4.1: Análisis químico del vidrio.

Vidrio (Sepiolita-nAg (TOLSA S.A.))									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	ZrO ₂	Ag
48,29	0,06	2,75	18,45	3,15	1,14	0,3	0,07	0,11	25,91

Tabla 4.2: Análisis químico de la sepiolita-nAg.

Vidrio (Sepiolita-nCu (TOLSA S.A.))									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	ZrO ₂	Cu
48,23	0,06	2,75	18,04	3,15	1,14	0,30	0,07	0,11	26,00

Tabla 4.3: Análisis químico de la sepiolita-nCu.

Vitelinato-nAg (ARGENOL S. L.)									
Na	Mg	Al	Si	Ca	C	S	N	O	Ag
4,44	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	33,20	0,75	8,79	28,49	21,05

Tabla 4.4: Análisis químico del vitelinato-nAg.

4.1.2. Distribución del tamaño de partícula

El vidrio sodocálcico fue molido y tamizado por debajo de $32\mu\text{m}$ para eliminar la fracción más gruesa. Posteriormente, se analizaron la distribución y tamaño de partícula. A los polvos comerciales de sepiolita-nAg, sepiolita-nCu y vitelinato-nAg también se les realizó un análisis granulométrico. En la tabla 4.5 se recogen los correspondientes tamaños medios de partícula.

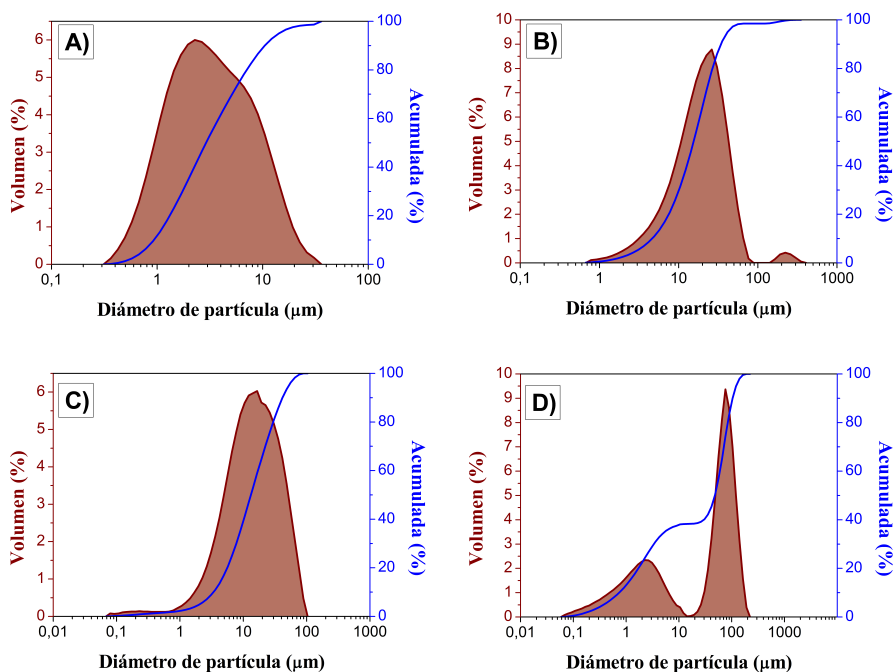


Figura 4.3: Distribución del tamaño de partícula de los polvos de partida: vidrio después de la molienda y el tamizado (A), sepiolita-nAg (B), sepiolita-nCu (C) y vitelinato-nAg (D).

En la figura 4.3 se muestran las distribuciones del tamaño de partícula para: (A) el vidrio tras ser molido y tamizado; (B) la sepiolita-nAg; (C) la sepiolita-nCu y (D) el vitelinato-nAg. En esta figura puede observarse la formación de aglomerados blandos de $\sim 10\mu\text{m}$ de tamaño de las fibras de sepiolita-nAg. Un comportamiento similar presenta la sepiolita-nCu. A su vez, el vitelinato-nAg está constituido por aglomerados blandos de ~ 3 y $100\mu\text{mm}$, presentando por tanto, una distribución de tamaño de partícula biomodal.

Tamaño medio de partícula, $d_{50}(\mu\text{m})$	
Vidrio	$2,9 \pm 0,4$
Sepiolita-nAg	18 ± 6
Sepiolita-nCu	13 ± 5
Vitelinato-nAg	48 ± 5

Tabla 4.5: Tamaño medio de partícula de los distintos polvos empleados como materiales de partida.

4.1.3. Difracción de Rayos X

En la figura 4.4 se muestran los difractogramas de rayos X obtenidos para el polvo de vidrio, sepiolita-nAg, sepiolita-nCu y vitelinato-nAg. En esta figura se observa el carácter amorfo del vidrio, las difracciones de Bragg de la plata metálica en la sepiolita-nAg y el vitelinato-nAg (JCPDS: 87-0720) y las difracciones de Bragg correspondientes al cobre metálico en el caso de la sepiolita-nCu (JCPDS: 85-1326). Por otra parte, no aparecen picos correspondientes a óxidos de plata ni de cobre.

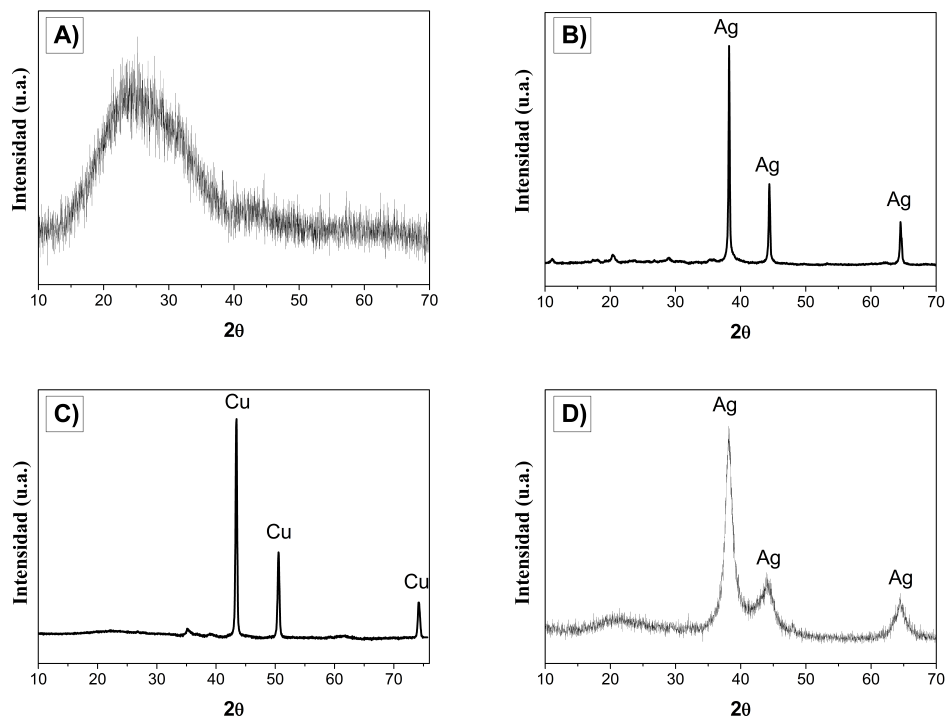


Figura 4.4: Difractogramas de rayos X de los polvos de partida empleados: vidrio después de la molienda y el tamizado (A), sepiolita-nAg (B), sepiolita-nCu (C) y vitelinato-nAg (D).

4.1.4. Espectroscopia UV-visible

Se realizó un estudio de espectroscopía UV-visible para las muestras de sepiolita-nAg, sepiolita-nCu y vitelinato-nAg. Las nanopartículas de plata y de cobre presentes en la sepiolita o en el vitelinato muestran un máximo de absorción que se corresponde con la resonancia del plasmón de superficie. Este fenómeno está asociado a un aumento importante del campo electromagnético local y tiene lugar cuando el campo interno de la

partícula tiende a infinito. Esto sucede si la constante dieléctrica del metal satisface la ecuación 4.1 y de esta manera el denominador de la ecuación de Laplace (ecuación 4.2) se anula.⁴

$$\varepsilon_p = \frac{(L_p - 1)\varepsilon_m}{L_p} \quad (4.1)$$

$$E_m = \frac{\varepsilon_m}{(1 - L_p)\varepsilon_m + L_p\varepsilon_p} E_{ext} \quad (4.2)$$

Donde L_p es el factor de forma o de despolarización, que para el caso de esferas es igual a $1/3$, ε_m y ε_p son las constantes dieléctricas de la matriz y las inclusiones, respectivamente, y E_{ext} es el campo externo. En general, tanto ε_m como ε_p son positivas, por lo que el campo interno es menor que el campo aplicado, pero ciertos materiales, como los metales poseen una constante dieléctrica negativa en un amplio rango de frecuencias, según se muestra en la figura 4.5. En esta figura aparece representada la constante dieléctrica de un metal en función de la frecuencia, empleando para ello el modelo de Drude corregido por Kreibig para partículas pequeñas^{5,6} (ecuación 4.3).

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\omega(\gamma_0 + v_F/r)} \quad (4.3)$$

Donde: $\omega = 2\pi c/\lambda$, ε_∞ es la constante dieléctrica, ω_p es la frecuencia de plasmón, $\gamma_0 = 1/\tau_s$ es el recíproco del tiempo de colisión y $v_F = 1,4 \cdot 10^6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, es la velocidad de Fermi.⁷ Según describe el modelo de Drude corregido por Kreibig, si $\omega > \omega_p/\varepsilon_\infty$, la constante dieléctrica del metal es mayor que cero y el comportamiento es similar al de un dieléctrico, es decir, los electrones del metal no siguen al campo y el material se comporta como un aislante (transparencia UV). Sin embargo,

si $\omega < \omega_p/\varepsilon_\infty$, el material posee una parte real negativa de la constante dieléctrica (ε') y una parte imaginaria positiva (ε''), de manera que ante una polarización, las cargas positivas se mueven hacia el sentido positivo del campo, al contrario que una carga libre.⁸⁻¹¹

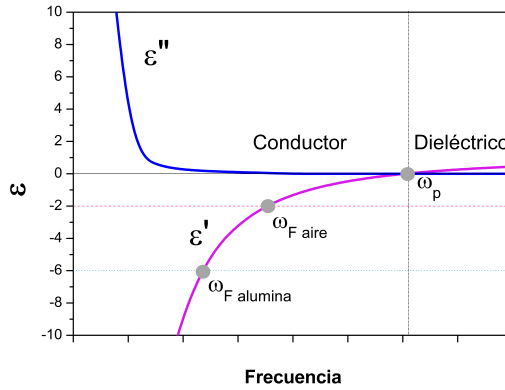


Figura 4.5: Representación de las partes real (ε') e imaginaria (ε'') de la constante dieléctrica de un metal en función de la frecuencia según el modelo de Drude corregido por Kreibig.

La longitud de onda a la cual se produce el fenómeno de la resonancia del plasmón de superficie está determinada por la ecuación 4.4 que se obtiene al tener en cuenta la ecuación 4.1 y la parte real de la ecuación 4.3. De esta manera, de la ecuación 4.4 se deduce que la longitud de onda a la que se produce la resonancia del plasmón de superficie (λ_{RPS}) depende de la forma de las partículas y de la constante dieléctrica que las rodea.

$$\lambda_{RPS} = \lambda_p \sqrt{\varepsilon_\infty - \left(1 - \frac{1}{l_p}\right)\varepsilon_m} \quad (4.4)$$

En la figura 4.6 se muestran los espectros de absorción en el rango UV-visible para las muestras de sepiolita-nAg, sepiolita-nCu y vitelinato-nAg.

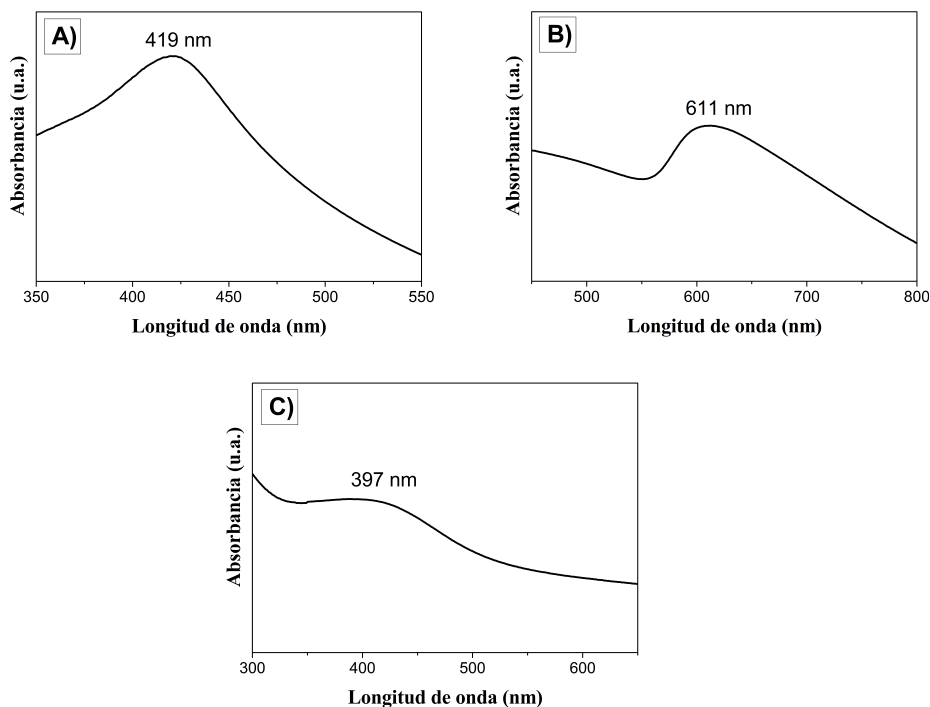


Figura 4.6: Espectros de absorción en el rango UV-visible para las muestras de: sepiolita-nAg (A), sepiolita-nCu (B) y vitelinato-nAg (C).

La presencia de la banda de absorción correspondiente a la resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas de plata es un hecho bien conocido y estudiado. Esta banda se encuentra situada en torno a los 400nm, aunque la posición exacta y la forma dependen del entorno, la concentración de nanopartículas en la matriz, de su forma y tamaño, y de

la distribución de tamaños de partícula.^{8,12,13} El caso de las nanopartículas de cobre también está bastante estudiado, mostrando su plasmón de superficie en torno a los 560nm para las nanopartículas esféricas.^{14–16}

4.1.5. Análisis térmico diferencial (ATD) y termogravimétrico (TG)

La evolución térmica del vitelinato-nAg en atmósfera de aire se muestra en la siguiente figura donde puede observarse una progresiva pérdida de peso hasta alcanzar $\sim 600^{\circ}\text{C}$. La pérdida total de peso determinada fue del 68,2%.

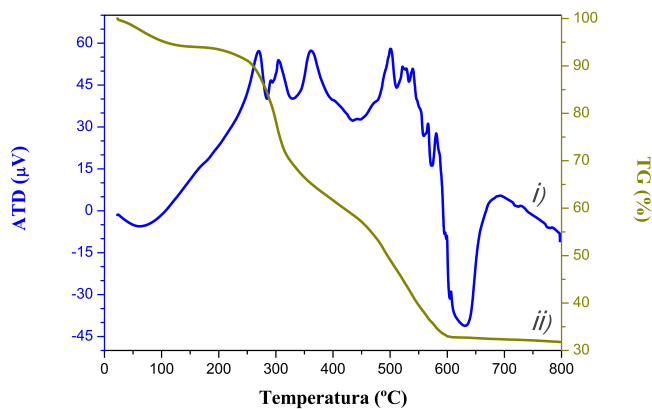


Figura 4.7: ATD del vitelinato-nAg (i) y TG del vitelinato-nAg (ii).

4.1.6. Caracterización microestructural

La microscopía electrónica de transmisión se utilizó para conocer la morfología, el tamaño de las nanopartículas y la distribución de éstas en las matrices de sepiolita y de vitelinato. Para apreciar mejor las nanopartículas de plata, también se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión en modo de alto ángulo y campo oscuro. En la figuras 4.8, 4.9 y 4.10 se muestran las micrografías electrónicas de transmisión para las muestras de sepiolita-nAg, sepiolita-nCu y vitelinato-nAg, respectivamente.

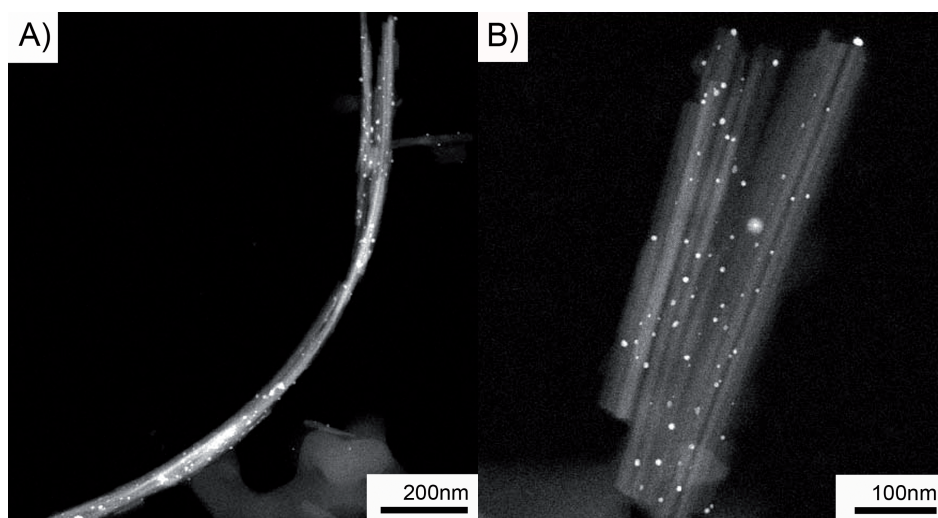


Figura 4.8: Micrografías electrónicas de transmisión en modo campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) a diferentes magnificaciones para la sepiolita-nAg.

En todas ellas puede observarse una distribución homogénea de las nanopartículas en el seno de la matriz. A su vez, a partir de las imágenes de microscopía electrónica se han determinado las distribuciones de tamaño de partícula de las nanopartículas que se recogen en la figura 4.11.

Como puede observarse en las figuras 4.8 y 4.11A, la sepiolita-nAg posee una estrecha distribución de tamaños de partícula, variando desde 1 hasta 20nm, con un tamaño medio de partícula (d_{50}) de $2,5\text{nm} \pm 0,3\text{nm}$. La sepiolita-nCu también presenta una estrecha distribución de tamaño de partícula, variando desde 1 hasta 70nm, y tiene un $d_{50} \sim 10 \pm 3\text{nm}$, según puede deducirse de las figuras 4.9 y 4.11B. Finalmente, las nanopartículas de plata presentes en el vitelinato-nAg pueden observarse en la figura 4.10. Dicho vitelinato-nAg posee una estrecha distribución de tamaño de partícula, variando desde 2 hasta 26nm, y un $d_{50} \sim 10 \pm 3\text{nm}$, según puede apreciarse en la figura 4.11C.

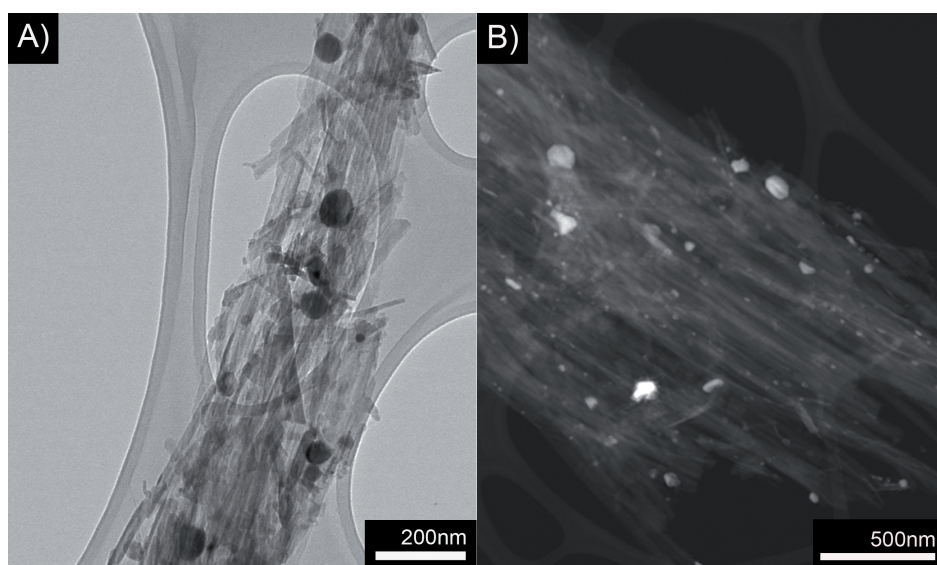


Figura 4.9: Micrografías electrónicas de transmisión de la muestra de sepiolita-nCu: en modo campo claro (A) y en modo campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) (B).

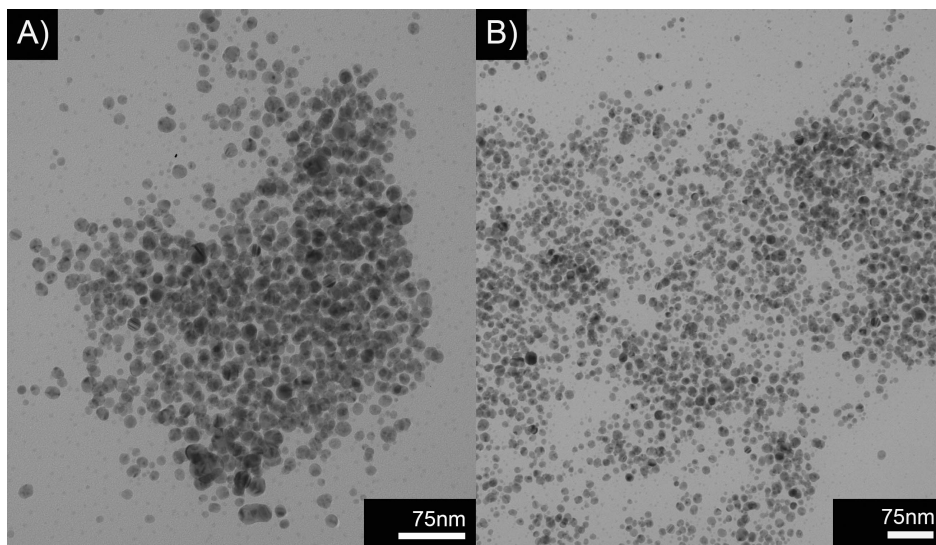


Figura 4.10: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión a diferentes magnificaciones de la muestra de vitelinato-nAg.

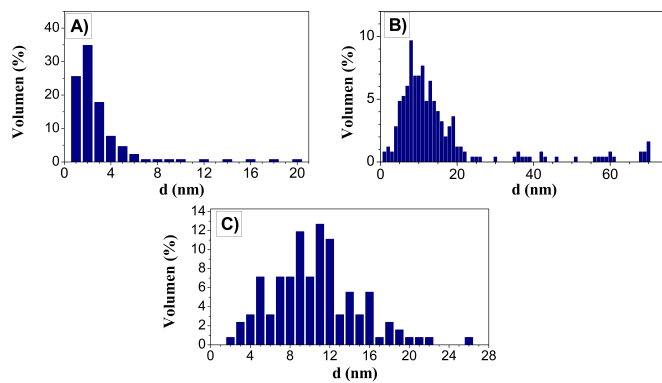


Figura 4.11: Distribuciones de tamaño de nanopartícula en las muestras de: sepiolita-nAg (A), sepiolita-nCu (B) y vitelinato-nAg (C).

4.2. Obtención de nanopartículas de plata y cobre embebidas en la matriz vítrea

El procesamiento de los materiales de partida para la obtención de nanopartículas de plata o cobre embebidas en la matriz vítrea posee mayor complejidad que los procesos convencionales debido a los problemas de coalescencia, aglomeración y oxidación que presentan las nanopartículas en general. El procesamiento cerámico difiere del procesamiento de otros materiales en que las características estructurales y constitucionales de los materiales de partida se desarrollan y modifican en cada estadio sucesivo. De esta manera, cada operación del procesamiento cerámico está relacionada tanto con aquellas operaciones que la preceden como con las que le siguen. Como consecuencia, cualquier cambio en las características de los materiales de partida o en cualquier operación intermedia producirá un cambio en las características del producto final. Por ello, para llegar a un conocimiento profundo del procesamiento se requiere determinar relaciones adecuadas entre las variables de procesamiento y las propiedades finales de los productos. La figura 4.12 muestra las posibles relaciones entre estos parámetros. De esta figura se deduce que las relaciones entre las variables de procesamiento y las propiedades de comportamiento pueden establecerse directa o indirectamente. Sin embargo, la relación directa es, en sí misma, inadecuada, siendo necesario entender cómo cada proceso afecta a las propiedades características y cómo éstas afectan a las propiedades de comportamiento. En cuanto a las relaciones indirectas, existen dos tipos y ambos son complejos. En el primer tipo de relación indirecta es necesario conocer como parámetro todas las características de los materiales de partida y todas las variables del proceso a excepción de una. En el segundo tipo se requiere encontrar una expresión analítica que relacione una propiedad de comportamiento con la característica que la afecta.¹⁷

Teniendo en cuenta lo anterior, se diseñó el procesamiento eligiendo en primer lugar una temperatura de sinterización del vidrio adecuada. Para

ello, se realizó una microscopía de calefacción del vidrio, mediante la cual se determinaron los puntos fijos de viscosidad (punto de deformación, esfera, media esfera y fluidez), que están representados en la figura 4.13 y se corresponden con las siguientes temperaturas: 668, 786, 901 y 1037°C.

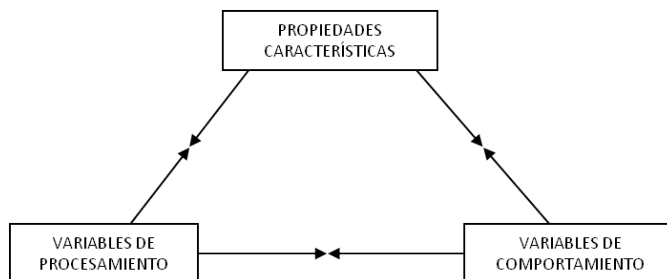


Figura 4.12: Relaciones que se pueden establecer entre las variables de procesamiento y las propiedades de los productos.



Figura 4.13: Puntos fijos de viscosidad del vidrio sodocálcico.

La temperatura de sinterización seleccionada debe ser superior a la temperatura de deformación (punto en el cual se comienza a formar la fase vítrea), pero solo ligeramente, para tener una fase vítrea de elevada viscosidad que dificulte la difusión de las nanopartículas y con ello, su aglomeración y coalescencia. En el caso de la adición de caolín o de sepiolita al vidrio, la viscosidad y punto de deformación se incrementan, como consecuencia del aporte de sílice, procedente de estos minerales, a la red vítrea. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, la temperatura de sinterización elegida fue 725°C.

Otro aspecto importante en el procesamiento es la velocidad de calentamiento (rampa de calentamiento) y el tiempo de mantenimiento del material a la temperatura final de cada rampa, ya que si se mantiene poco tiempo es posible que no sea suficiente para la vitrificación pero, por el contrario, si se mantiene demasiado tiempo aumenta la difusión de las nanopartículas, dando lugar a un material con mayor cantidad de aglomerados. En el caso del vitelinato-nAg, la rampa de calentamiento es crítica, según fue comprobado, ya que se produce la calcinación de los compuestos orgánicos que lo constituyen liberándose diferentes gases (NO_x , $\text{H}_2\text{O}_{\text{vapor}}$, CO_2). Si el calentamiento es muy rápido estos gases son liberados en grandes proporciones formando espumas e impiden la homogénea y completa calcinación del material. Estos factores son tan críticos que cualquier variación produce un material aglomerado e inservible para nuestro propósito. A continuación se muestran dos ejemplos para ilustrar la importancia del procesamiento y su influencia en las propiedades finales del material. En el primer ejemplo, la rampa de calentamiento fue demasiado rápida, obteniéndose las espumas antes mencionadas (figura 4.14A). En este caso se sinterizó una mezcla de vidrio/vitelinato-nAg con una relación (peso/peso)=1/2, empleando una rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 725°C y manteniendo la mezcla a esta temperatura durante 1h. El segundo ejemplo se corresponde con un tiempo excesivo de calcinación a alta temperatura (12h a 600°C), produciéndose una elevada difusión de las nanopartículas dando lugar a su aglomeración y coalescencia, según se observa en la micrografía de microscopía electrónica de barrido de la figura 4.14B, donde se muestran aglomerados de varias micras de partículas de plata, en lugar de la plata nanométrica que debería haberse obtenido. Por último, se muestra un ejemplo de una elección correcta tanto de la velocidad de calentamiento como del tiempo empleado en la calcinación del vitelinato-nAg. En este último caso se empleó una rampa de calentamiento de $3^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 500°C , manteniéndolo 1h a esta temperatura para posteriormente calentar a $3^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 725°C y mantenerlo 1h.

La atmósfera utilizada es crítica. Los vidrios que contienen cobre son muy

sensibles a las variaciones de las condiciones redox. En condiciones oxidantes (atmósfera de aire) el cobre se incorpora al vidrio como catión Cu^{2+} produciendo una coloración azul turquesa, conocida desde la antigüedad y ampliamente utilizada por los vidrieros egipcios. Sin embargo, en condiciones de atmósfera inerte, las nanopartículas de cobre metálico procedentes de la sepiolita se dispersan coloidalmente en el vidrio dando lugar a una coloración del vidrio rojo rubí.¹⁸

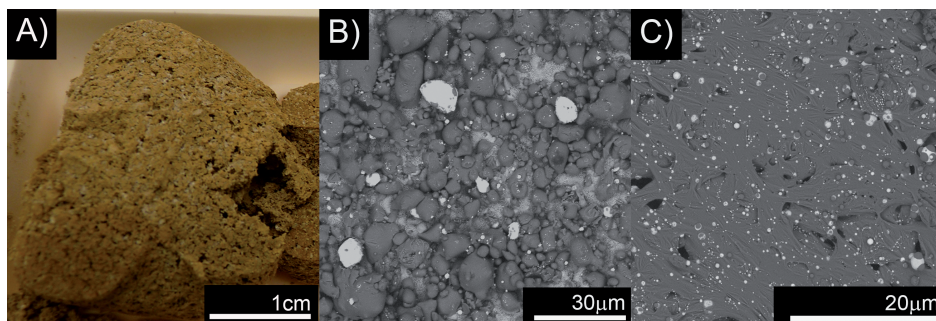


Figura 4.14: Ejemplos de diferentes procesamientos. Imagen de la espuma formada al calcinar demasiado rápido ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) una mezcla de vidrio/vitelinato-nAg=1/2 (A), micrografía de MEB de una mezcla de vidrio/vitelinato-nAg=1/2 sinterizada durante 12h a 600°C (B) y micrografía de MEB de una mezcla de vidrio/vitelinato-nAg=1/2 sinterizada a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 1h hasta 500°C y calentando a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ posteriormente hasta 725°C , 1h (C).

Finalmente, la obtención de nanopartículas de cobre o plata embebidas en una matriz vítrea se realizó teniendo en cuenta todos los aspectos de procesamiento anteriores y se describe a continuación:

1. Molienda y posterior tamizado del vidrio sodocálcico comercial hasta obtener un polvo con un tamaño de partícula inferior a $32\mu\text{m}$.
2. Mezclado homogéneo por vía húmeda del polvo de vidrio obtenido

con la fuente de nanopartículas de plata o cobre correspondiente (vitelinato-nAg, sepiolita-nAg o sepiolita-nCu). En todos los casos los polvos de vidrio-nMetal obtenidos contienen una cantidad de nanometal (plata o cobre) del 2,6 % (peso). El disolvente empleado para la homogenización fue isopropanol (2-propanol, PA-ACS-ISO, suministrado por Panreac Química S. A. U.). Este disolvente fue elegido debido a que ninguno de los materiales es soluble en isopropanol y posee un punto de ebullición bajo, por lo que se evapora rápidamente.

3. Secado en estufa de los polvos obtenidos a 40°C.
4. Prensado uniaxial en pastillas cilíndricas de 1cm de diámetro de los polvos vidrio-nMetal anteriormente obtenidos.
5. Sinterización de las pastillas obtenidas a 725°C durante una hora. Se emplearon dos tipos de atmósferas: **atmósfera de aire** para la obtención de nanopartículas de plata monodispersas en la matriz vítrea y para la incorporación de cobre a la red vítrea; y **atmósfera de argón** en el caso de la obtención de nanopartículas de cobre metálicas monodispersas en la matriz vítrea. La rampa de calentamiento fue de 10°C/min para todos los casos a excepción del vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg en cuyo caso fue más lenta, de 3°C/min. Esto se debe a que el vitelinato es una proteína como se ha comentado al comienzo del capítulo, y en atmósfera de aire se produce su calcinación, según se observa en la figura 4.7. Esta figura corresponde al análisis térmico diferencial y al análisis termogravimétrico del vitelinato-nAg, mostrando una pérdida progresiva de peso hasta ~600°C, siendo la pérdida total del 68,2%. Esta pérdida de masa provoca la formación de espumas como consecuencia de la liberación de gases (NO_x, vapor de agua y CO₂) derivados de la calcinación del vitelinato. De este modo, para que la calcinación sea completa, es decir, que haya suficiente oxígeno en el interior del horno, y para evitar la formación de grandes espumas en su interior, la rampa de calentamiento deber ser lenta. Además es

necesario mantener la mezcla de vidrio/vitelinato-nAg durante 1h a 500°C, con el fin de calcinar la materia orgánica, para luego proseguir con una rampa semejante de 3°C/min hasta alcanzar los 725°C y mantener dicha mezcla a esta temperatura durante 1h para lograr la sinterización del vidrio y finalizar la calcinación del vitelinato-nAg.

6. Molienda y posterior tamizado de las pastillas sinterizadas del vidrio sodocálcico comercial, que ya contiene las nanopartículas de plata o cobre incorporadas en su matriz, hasta obtener un polvo con un tamaño de partícula inferior a 32 μ m.

4.3. Caracterización de los polvos de vidrio obtenidos

El vidrio en polvo con 2,6% (peso) de nanopartículas de plata (denominado a partir de ahora como vidrio-nAg), obtenido bien a partir de sepiolita-nAg o bien a partir de vitelinato-nAg, fue caracterizado mediante análisis químico, difracción de Rayos X, espectroscopía UV-visible, microscopía electrónica y resonancia magnética nuclear. También fueron caracterizados mediante estas técnicas el polvo de vidrio con 2,6% (peso) de nanopartículas de cobre dispersadas coloidalmente en el vidrio (denominado vidrio-nCu), obtenido a partir de la sepiolita-nCu en atmósfera de argón, y el polvo de vidrio con el cobre incorporado a la red (2,6%), obtenido a partir de sepiolita-nCu, pero en atmósfera de aire (denominado vidrio-Cu_{incorporado}).

4.3.1. Análisis químico

En las tablas 4.6 y 4.7 se recogen los análisis químicos (%peso) de los polvos de vidrio-nAg obtenidos a partir de sepiolita-nAg y de vitelinato-nAg.

Vidrio-nAg obtenido a partir de sepiolita-nAg									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	Ag
67,77	5,98	13,82	6,71	0,15	1,76	0,54	0,20	0,07	2,59

Tabla 4.6: Análisis químico del vidrio-nAg obtenido a partir de sepiolita-nAg.

Vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	Ag
67,46	6,82	16,49	3,07	0,05	1,64	1,02	0,02	0,00	2,60

Tabla 4.7: Análisis químico del vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg.

En las tablas 4.8 y 4.9 se presentan los análisis químicos de los polvos de vidrio con cobre. Ambos muestran el mismo análisis químico, puesto que la composición química es la misma, la única diferencia es la atmósfera en la que fueron sinterizados.

Vidrio-nCu obtenido a partir de sepiolita-nCu en atmósfera de argón									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	Cu
67,79	6,13	15,14	5,59	0,13	1,62	0,53	0,14	0,05	2,60

Tabla 4.8: Análisis químico del vidrio-nCu obtenido a partir de sepiolita-nCu en atmósfera de argón.

Vidrio-Cu _{incorporado} obtenido a partir de sepiolita-nCu en aire									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	Cu
67,79	6,13	15,14	5,59	0,13	1,62	0,53	0,14	0,05	2,60

Tabla 4.9: Análisis químico del polvo de vidrio-Cu_{incorporado} obtenido a partir de la sepiolita-nCu en atmósfera de aire.

4.3.2. Difracción de Rayos X

Los polvos de vidrio-nAg obtenidos a partir de la sepiolita-nAg y de vitelinato-nAg fueron analizados mediante difracción de Rayos X. En la figura 4.15 se representan los difractogramas de Rayos X de dichos polvos, donde se observa el carácter amorfo del vidrio, las difracciones de Bragg correspondientes a la plata metálica (JCPDS: 87-0720) y ciertos silicatos sódicos, cálcicos y sodocálcicos: Na_2SiO_3 (JCPDS: 16-0818), $\text{Na}-2\text{Si}_3\text{O}_7$ (JCPDS: 86-0436), $\text{NaCa}_2\text{Si}_3\text{O}_8\text{OH}$, (JCPDS: 12-0238), CaSiO_3 (JCPDS: 10-0486), Ca_2SiO_4 (JCPDS: 09-0369) y $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_2\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS: 21-1349), los cuales indican una ligera desvitrificación del vidrio como consecuencia del tratamiento térmico.

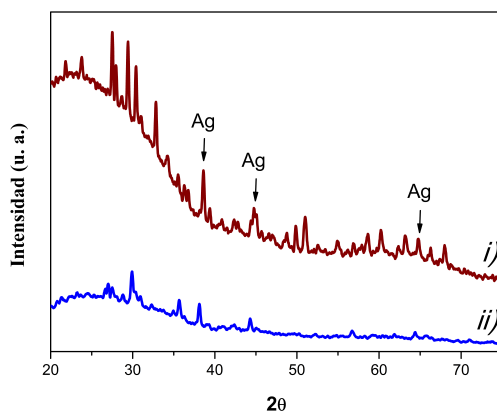


Figura 4.15: Difractogramas de rayos X para: vidrio-nAg obtenido a partir de sepiolita-nAg (i) y vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg (ii).

En la figura 4.16 se representan los difractogramas de Rayos X de los polvos de vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$ (i) y vidrio-nCu (ii), donde se observa el carácter amorfo del vidrio. El difractograma del vidrio-nCu muestra las

difracciones de Bragg del cobre metálico (JCPDS: 85-1326). En dicho difractograma no se observan picos de óxidos de cobre, indicando que no se ha producido la oxidación de las nanopartículas de cobre, y casi no presenta desvitrificación. Por el contrario, en el difractograma del vidrio-Cu incorporado aparecen las difracciones de Bragg del CuO (JCPDS: 44-706) y de compuestos sodocálcicos cristalinos que aparecen como consecuencia del tratamiento térmico y por la incorporación del cobre a la red vítrea, que la modifica y produce una mayor desvitrificación.

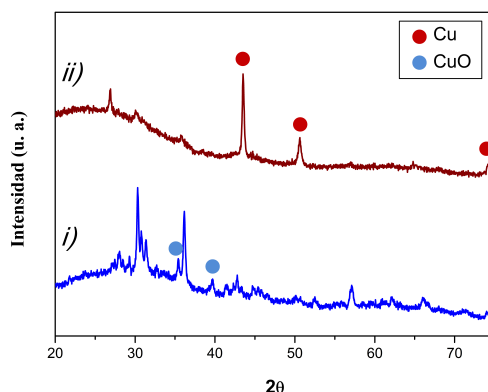


Figura 4.16: Difractogramas de Rayos X para polvo de: vidrio-Cu_{incorporado} (i) y vidrio-nCu (ii).

4.3.3. Espectroscopia UV-visible

Igual que en el caso de los materiales de partida, se realizó un estudio de espectroscopía UV-visible con el objeto de confirmar la presencia de nanopartículas metálicas en los polvos de vidrio obtenidos. En la figura 4.17 se recogen las medidas de absorción en el rango UV-visible del polvo

de vidrio-nAg obtenido a partir sepiolita-nAg y del obtenido a partir de vitelinato-nAg. En esta figura se observa el máximo de absorción correspondiente al plasmón de superficie de la plata localizado a $\sim 417\text{nm}$. Esto corrobora que la plata se mantiene en estado metálico, es decir, que no se ha oxidado ni se ha incorporado a la red vítrea. Además, también se mantiene en estado nanométrico, puesto que las partículas de mayor tamaño no muestran resonancia de plasmón de superficie, según se explicó en el apartado 4.1.4, lo que significa que no se han producido aglomeración ni coalescencia significativas de las nanopartículas de plata durante el proceso de obtención de los vidrios-nAg. Por otra parte, las bandas de absorción para los polvos de vidrio-nAg son más estrechas que las correspondientes a sus respectivas fuentes de nanopartículas (sepiolita-nAg y vitelinato-nAg), lo cual indica que la distribución de tamaño de las nanopartículas es también más estrecha. Este hecho se comprobará mediante microscopía electrónica de transmisión.

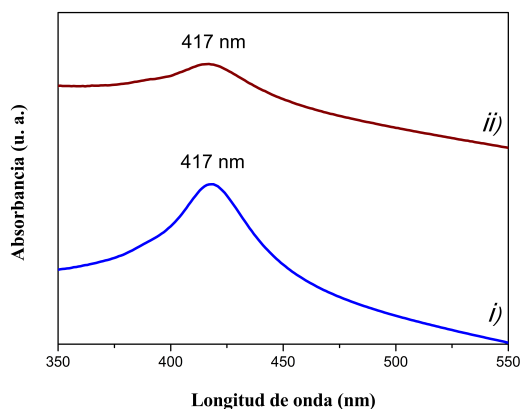


Figura 4.17: Espectros de absorción correspondientes a los polvos de vidrio-nAg obtenidos a partir de: sepiolita-nAg (i) y vitelinato-nAg (ii).

En la figura 4.18 se muestra la espectroscopía UV-visible de los polvos de vidrio-Cu_{incorporado} y de vidrio-nCu. En el caso del polvo de vidrio-nCu puede observarse la resonancia del plasmón de superficie correspondiente a las nanopartículas de cobre metálico, lo que confirma que las nanopartículas de cobre no se han oxidado con el tratamiento térmico y tampoco han coalescido de manera significativa. Sin embargo, en el caso del vidrio con cobre sinterizado en aire, no aparece máximo de absorción, ya que el cobre no se encuentra en estado metálico, sino incorporado a la red vítrea como Cu²⁺.

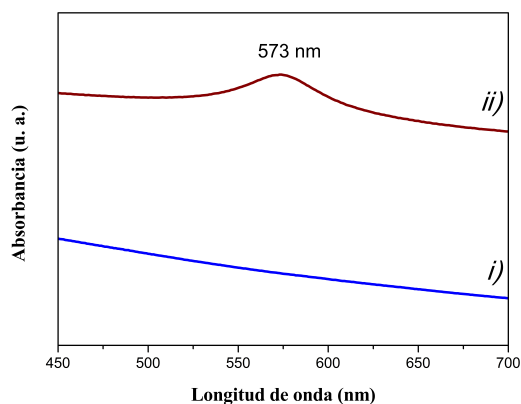


Figura 4.18: Espectros de absorción para: polvo de vidrio-Cu_{incorporado} (i) y polvo de vidrio-nCu (ii).

4.3.4. Caracterización microestructural

La caracterización microestructural mediante microscopía electrónica de los polvos de vidrio obtenidos sirvió para determinar la morfología, distribución y tamaño de las nanopartículas en la matriz vítrea, así como los posibles cambios estructurales ocurridos.

4.3.4.1. Microscopía electrónica de barrido

En la figura 4.19 se muestran las micrografías electrónicas de barrido para los polvos de vidrio-nAg obtenidos a partir de sepiolita-nAg (figura 4.19A) y de vitelinato-nAg (figura 4.19B). Ambos polvos de vidrio-nAg muestran una morfología similar y una distribución homogénea de las nanopartículas de plata en el seno de la matriz vítrea.

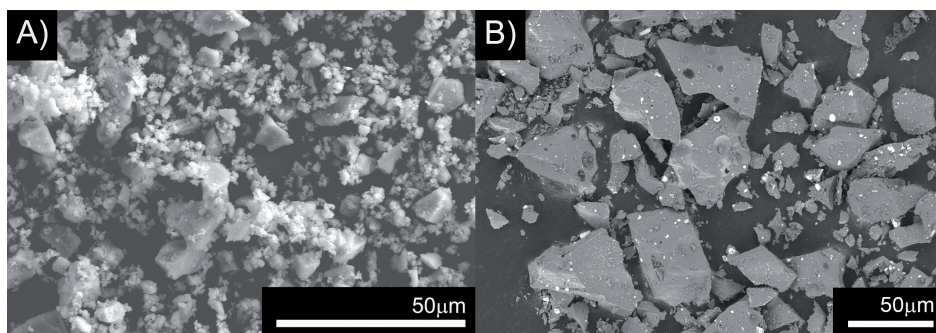


Figura 4.19: Micrografías electrónicas de barrido del polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de: sepiolita-nAg (A) y de vitelinato-nAg (B).

La figura 4.20 corresponde a las micrografías electrónicas de barrido para el polvo de vidrio-Cu_{incorporado} sinterizado en atmósfera de aire (figura 4.20A) y para el polvo de vidrio-nCu que fue sinterizado en atmósfera de argón (figuras 4.20B y 4.20C). En las figuras 4.20B y 4.20C pueden apreciarse las partículas de cobre dispersas coloidalmente y de manera homogénea en el seno de la matriz vítrea. Por el contrario, como se observa en la figura 4.20A, el cobre está en estado catiónico (Cu^{2+}) formando parte de la red vítrea, ya que se ha incorporado a ésta, de manera que no se observa ninguna partícula de cobre metálico.

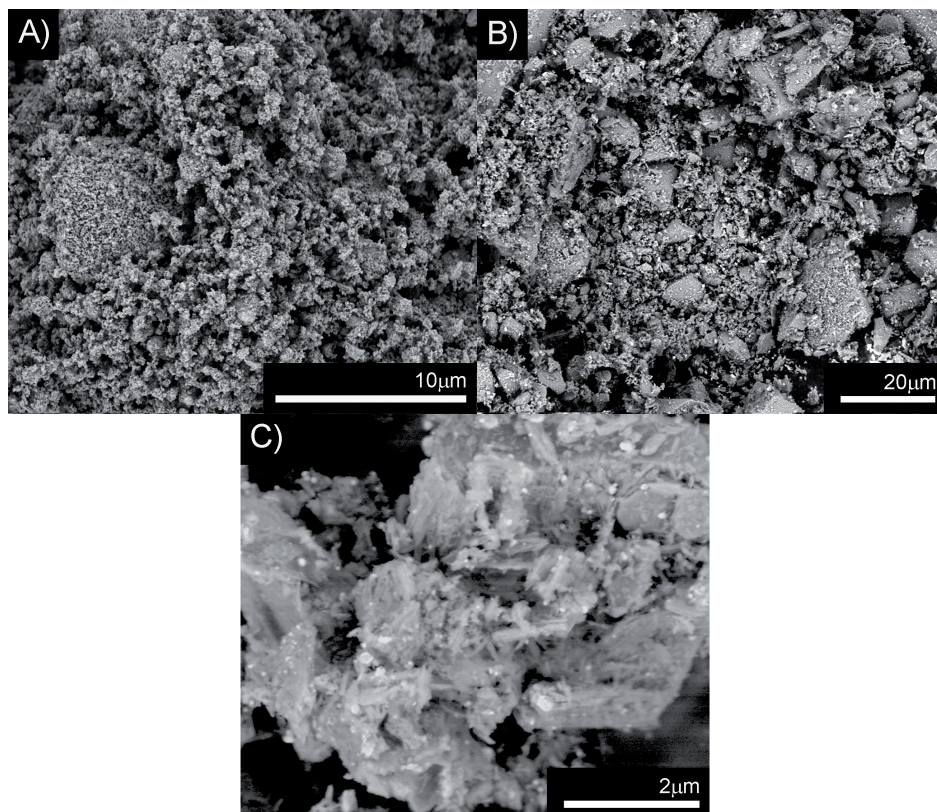


Figura 4.20: Micrografías electrónicas de barrido del polvo de vidrio-Cu_{incorporado} (A) y polvo de vidrio-nCu (B y C).

4.3.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

En la figura 4.21 se recogen las micrografías electrónicas de transmisión para los polvos de vidrio-nAg obtenidos a partir de sepiolita-nAg (A, B y C) y a partir de vitelinato-nAg (D, E y F). En la figura 4.22 se han representado las distribuciones de tamaño de partícula para las nanopartículas de plata, observándose una distribución homogénea de

dichas nanopartículas en ambos vidrios.

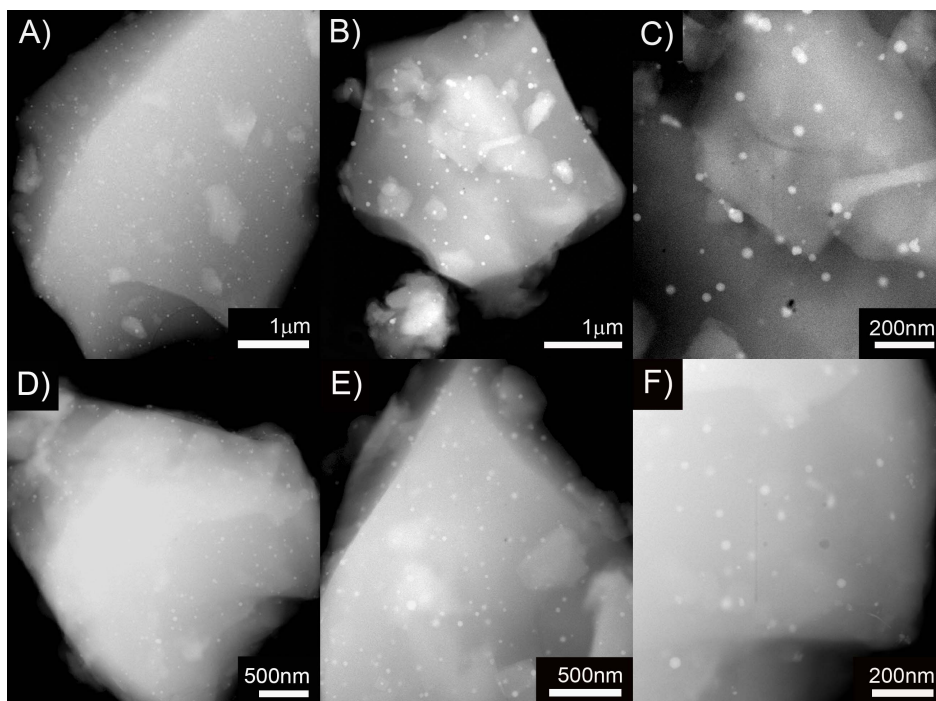


Figura 4.21: Micrografías electrónicas de transmisión en modo campo oscuro de alto ángulo (HAADF) del polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de: sepiolita-nAg (A, B y C) y a partir de vitelinato-nAg (D, E y F).

En el caso del vidrio-nAg obtenido a partir de sepiolita, el tamaño medio de partícula (d_{50}) es 10 veces superior al de la sepiolita-nAg de partida, siendo de $24 \pm 3 \text{ nm}$, y la distribución de tamaño de partícula se ha ensanchado levemente, variando desde 4 hasta 44 nm. En el caso del vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg, el d_{50} también se ha incrementado, aunque menos, siendo de $16 \pm 5 \text{ nm}$ y la distribución de tamaño se ha ensanchado ligeramente en relación a la del vitelinato-nAg

de partida, variando desde 5 hasta 32nm. Esto se debe a que las nanopartículas de menor tamaño tienen una elevada energía interfacial que implica una alta tendencia a coalescer. Sin embargo, las nanopartículas de mayor tamaño permanecen estables debido la creación en torno suyo de una fase vítrea rica en sílice y altamente viscosa lo que impide su difusión y coalescencia.

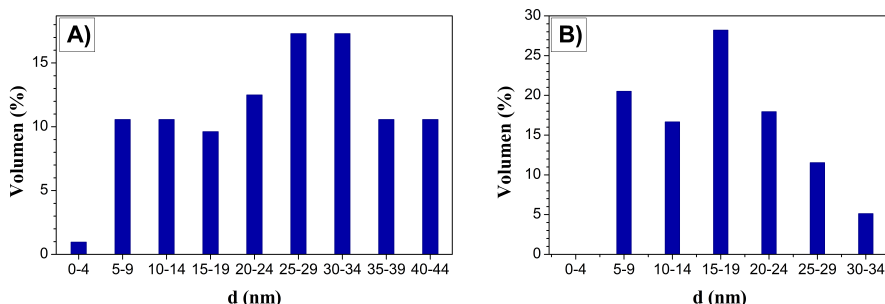


Figura 4.22: Distribución del tamaño de partícula para las nanopartículas de plata en el polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de: sepiolita-nAg (A) o de vitelinato-nAg (B).

En la figura 4.23 se muestran en las micrografías electrónicas de transmisión para los polvos de vidrio con cobre obtenidos en atmósfera de argón que corresponden a los vidrios-nCu (figuras 4.23A, 4.23B y 4.23C) y para los polvos de vidrio con cobre incorporado a la red, obtenidos en atmosfera de aire (figuras 4.23D, 4.23E y 4.23F). También se realizó un estudio de la distribución de tamaño de partícula para las nanopartículas de cobre contenidas en el vidrio-nCu (figura 4.24).

El vidrio-nCu (figuras 4.23A, 4.23B y 4.23C) presenta una distribución homogénea de las nanopartículas de cobre en la matriz vítrea, con un rango de tamaños entre 5nm y 70nm (figura 4.24), similar al de la

sepiolita-nCu de partida, indicando que no se ha producido coalescencia significativa de las nanopartículas ni su oxidación, corroborándose de este modo el estudio de absorción. La coalescencia que ha tenido lugar, igual que en los casos de los vidrios-nAg, ha sido la de las nanopartículas de menor tamaño, de manera que el d_{50} se ha incrementado muy ligeramente hasta $\sim 13 \pm 1\text{nm}$.

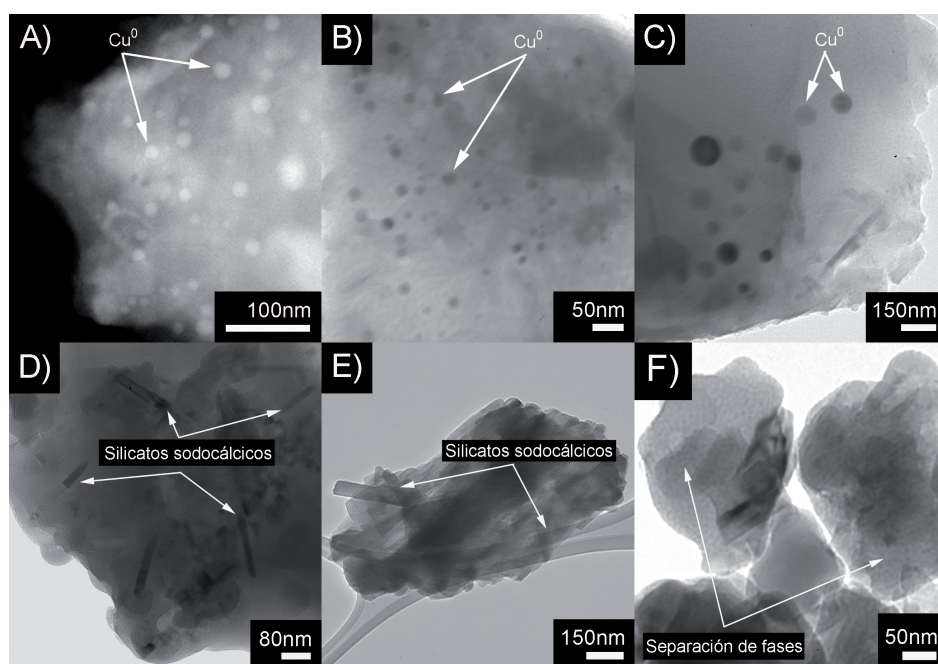


Figura 4.23: Micrografías electrónicas de transmisión para: polvo de vidrio-nCu obtenido en atmósfera de argón (A, B y C), y de polvo de vidrio conteniendo Cu^{2+} obtenido en atmósfera de aire (D, E y F). La micrografía A está tomada a alto ángulo en modo campo oscuro (HAADF).

Por el contrario, en el caso del polvo de vidrio obtenido en atmósfera de aire, el cobre no aparece en forma de nanopartículas metálicas, sino que se

ha incorporado a la red vítrea modificando las propiedades del vidrio, recibiendo por ello la denominación de ión modificador. Es preciso que la acomodación de los iones modificadores en los huecos de la red, en este caso el Cu^{2+} , no ocasione un aumento elevado de la energía reticular para que el vidrio sea estable y no se produzca su cristalización. En este caso se observa la cristalización de silicatos sodocálcicos¹⁹ (figuras 4.23D y 4.23E) debido a la incorporación del cobre a la red, aunque no es suficiente para desestabilizar el vidrio.

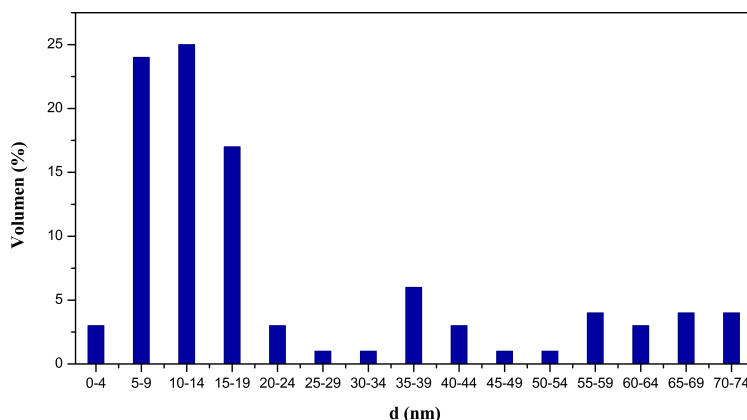


Figura 4.24: Distribución de tamaño de partícula para las nanopartículas de cobre contenidas en el vidrio-nCu (obtenido en atmósfera de argón).

Por otra parte, en la figura 4.23F se aprecia una separación de fases líquidas. Esto ocurre en los sistemas $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ cuando el tamaño del ión modificador es pequeño y su carga elevada, es decir, cuando el ión modificador posee un gran poder polarizante, y por tanto, una elevada intensidad de campo, según se muestra en la figura 4.25.²⁰

Como puede verse en el diagrama de equilibrio de la figura 4.25 los vidrios con cationes de pequeño radio, en este caso el Cu^{2+} , presentan una gran tendencia a la inmiscibilidad dentro de un amplio intervalo de concentraciones, la cual se pone de manifiesto ya por encima de la curva de *liquidus*.

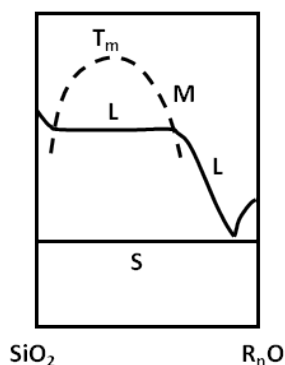


Figura 4.25: Diagrama de equilibrio y curva de inmiscibilidad en un sistema binario $\text{R}_n\text{O-SiO}_2$.

4.3.5. Resonancia magnética nuclear

En la figura 4.26 se han representado los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) correspondientes al ^{29}Si para las siguientes muestras: vidrio, vidrio conteniendo la misma cantidad de sepiolita que se adiciona para obtener el vidrio-nCu (denominado como vidrio-sepiolita), vidrio-nCu y vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$.

De esta figura se desprende que el espectro de resonancia magnética nuclear correspondiente al vidrio está constituido por una banda ancha y asimétrica centrada en $\sim 94\text{ppm}$, lo cual se puede atribuir a unidades estructurales Q^4 de silicio (4OP). Esta estructura solo se ve afectada en el caso del vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$, donde aparece una banda hacia $\sim 85\text{ppm}$,

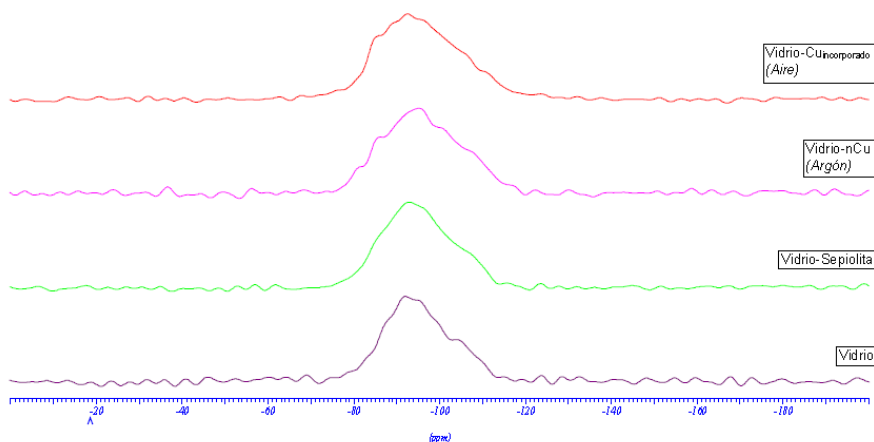


Figura 4.26: Espectros de RMN del ^{29}Si .

indicando la presencia de Q^3 . Esto puede ser debido a la incorporación de Cu^{2+} a la red vítrea como modificador de red. Se ha de poner de manifiesto el escaso número de trabajos que han sido publicados sobre vidrios con Cu^{2+} . Por ello, se necesitaría en un futuro realizar un estudio más extenso sobre estos vidrios, para poder determinar con precisión sus márgenes de estabilidad y la secuencia de aparición de fases cristalinas durante el enfriamiento.

4.4. Actividad biocida de las nanopartículas de plata dispersas en una matriz vítrea

La actividad biocida fue evaluada para las muestras de vidrio-nAg obtenidos a partir de sepiolita-nAg y de vitelinato-nAg. Para comparar las actividades biocidas, también se evaluaron los efectos antimicrobianos de los materiales de partida: vidrio sodocálcico, sepiolita-nAg y vitelinato-nAg. Los microorganismos empleados fueron los que se

estudiaron en el capítulo anterior: la bacteria gram-negativa *Escherichia coli* JM110, la bacteria gram-positiva *Micrococcus luteus* y la levadura *Issatchenkia orientalis* perteneciente a la colección ATCC 6258, también conocida como *Candida krusei*. Igualmente, todos los ensayos se realizaron por triplicado y siguiendo el procedimiento de cultivo en medio líquido descrito en el capítulo de materiales y métodos. La concentración de plata en todos los cultivos fue la empleada en el capítulo 3 (360ppm), con objeto de hacer comparables los resultados obtenidos. De igual modo se calculó la reducción logarítmica del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cultivo cada 24h, siguiendo la ecuación 4.1:

$$\text{Reducción logarítmica} = \log A - \log B \quad (4.5)$$

Donde A es el número de UFC/mL en el control después de 24 y 48h, y B es el número de UFC/mL en el cultivo que contiene al agente biocida tras las correspondientes 24 y 48h.

En la tabla 4.10 se han recogido las unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo de *E. coli* con: (A y B) agua y nutrientes, que se usaron como controles, (C) el vidrio, (D) la sepiolita-nAg en polvo, (E) el vitelinato-nAg en polvo, (F) el polvo de vidrio obtenido a partir de sepiolita-nAg (vidrio-nAg 1) y (G) el polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg (vidrio-nAg 2).

Debido al elevado número de experimentos, los ensayos se realizaron en dos secuencias, por un lado se estudió la actividad biocida frente a *E. coli* JM110 de: el vidrio, la sepiolita-nAg y el vidrio-nAg 1, y el cultivo control que le corresponde a esta secuencia es el denominado como control 1 (A). Por otro lado, en la segunda secuencia se estudió la actividad biocida frente a *E. coli* JM110 de: vitelinato-nAg y vidrio-nAg 2, correspondiendo a este ensayo el control 2 (B). También se calculó la reducción logarítmica de las UFC tras 24 y 48h (tabla 4.13) para las muestras anteriores.

Este mismo ensayo biocida también fue realizado sobre la bacteria gram-positiva *M. luteus* y dividiendo los experimentos en las mismas secuencias que en el caso de *E. coli* JM110. Los resultados se representan en las tablas 4.11 y 4.13. Por último, se empleó la levadura *I. orientalis* en un ensayo similar a los anteriores. Los resultados se recogen en las tablas 4.12 y 4.13.

	UFC/ml de <i>E. coli</i> JM110		
	0h	24h	48h
Control 1 (A)	$6,90 \cdot 10^9$	$5,57 \cdot 10^{11}$	$1,22 \cdot 10^{12}$
Control 2 (B)	$3,90 \cdot 10^9$	$9,40 \cdot 10^{11}$	$1,60 \cdot 10^{12}$
Vidrio (C)	$6,90 \cdot 10^9$	$9,00 \cdot 10^{11}$	$6,00 \cdot 10^{11}$
Sepiolita-nAg (D)	$6,90 \cdot 10^9$	0	0
Vitelinato-nAg (E)	$3,90 \cdot 10^9$	0	0
Vidrio n-Ag 1 (F)	$6,90 \cdot 10^9$	0	0
Vidrio n-Ag 2 (G)	$3,90 \cdot 10^9$	$3,00 \cdot 10^5$	0

Tabla 4.10: UFC·mL⁻¹ de *E. coli* JM110.

Como puede deducirse de las tablas 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13 en el caso del vidrio, el recuento de los tres microorganismos diferentes estudiados es similar al del control, obteniéndose una reducción logarítmica muy baja, lo que significa que no posee actividad biocida. Por el contrario, el resto de materiales estudiados poseen una buena actividad frente a los dos tipos de bacterias, mostrando en todos los casos una reducción logarítmica >4 , lo que significa una desinfección segura, según la regulación de agua potable primaria nacional creada por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA), la cual está disponible en la página web del Código de Regulaciones Federales²¹. En el caso de la levadura *I. orientalis* solamente dos materiales alcanzan una reducción logarítmica >4 tras 24h, el vitelinato-nAg y el vidrio obtenido a partir de sepiolita-nAg. A partir de las 48h el vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato también logra una

desinfección segura, mientras que la sepiolita-nAg sigue sin ser activa. De este modo, el estudio de la actividad biocida de los vidrios-nAg muestra que estos materiales son altamente biocidas puesto que alcanzan una desinfección segura en 48h frente a tres tipos de microorganismos diferentes (bacteria gram-negativa, bacteria gram-positiva y levadura).

	UFC/ml de <i>M. luteus</i>		
	0h	24h	48h
Control 1 (A)	$4,30 \cdot 10^8$	$8,84 \cdot 10^{10}$	$1,79 \cdot 10^{11}$
Control 2 (B)	$2,20 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^{11}$	$2,00 \cdot 10^{11}$
Vidrio (C)	$4,30 \cdot 10^8$	$6,50 \cdot 10^9$	$3,20 \cdot 10^9$
Sepiolita-nAg (D)	$4,30 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^5$	$1,70 \cdot 10^3$
Vitelinato-nAg (E)	$2,20 \cdot 10^8$	0	0
Vidrio n-Ag 1 (F)	$4,30 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^4$	0
Vidrio n-Ag 2 (G)	$2,20 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^4$

Tabla 4.11: UFC·mL⁻¹ de *M. luteus*.

	UFC/ml de <i>I. orientalis</i>		
	0h	24h	48h
Control 1 (A)	$2,30 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^{10}$	$2,00 \cdot 10^{10}$
Control 2 (B)	$1,5 \cdot 10^6$	$5,10 \cdot 10^{10}$	$2,90 \cdot 10^{11}$
Vidrio (C)	$2,30 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^9$	$4,80 \cdot 10^9$
Sepiolita-nAg (D)	$2,30 \cdot 10^8$	$4,30 \cdot 10^8$	$4,70 \cdot 10^8$
Vitelinato-nAg (E)	$1,5 \cdot 10^6$	0	0
Vidrio n-Ag 1 (F)	$2,30 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^4$	$9,00 \cdot 10^4$
Vidrio n-Ag 2 (G)	$1,5 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^{10}$	$3,78 \cdot 10^3$

Tabla 4.12: UFC·mL⁻¹ de *I. orientalis*.

	Reducción logarítmica de UFC					
	<i>E. coli</i> JM110		<i>M. luteus</i>		<i>I. orientalis</i>	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Vidrio	0,00±0,05	0,31±0,05	1,13±0,03	1,75±0,02	1,08±0,2	0,62±0,2
Sep.n-Ag	11,75±0,07	12,09±0,09	5,65±0,04	8,02±0,05	1,84±0,2	1,63±0,24
Vitel.n-Ag	11,97±0,03	12,20±0,04	11,04±0,09	11,30±0,04	10,71±0,04	11,46±0,04
Vid.n-Ag1	11,75±0,06	12,09±0,05	6,95±0,03	11,25±0,03	5,88±0,04	5,35±0,04
Vid.n-Ag2	6,50±0,04	12,20±0,05	6,04±0,03	7,00±0,03	0,41±0,05	3,88±0,09

Tabla 4.13: Reducción logarítmica de las unidades formadoras de *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* para el vidrio, la sepiolita-nAg, el vitelinato-nAg, el vidrio-nAg 1 y el vidrio-nAg 2 tras 24 y 48h de ensayo biocida.

4.4.1. Estudio de la toxicidad y del mecanismo de acción biocida de los polvos de vidrio-nAg obtenidos

Dado que algunas de las posibles aplicaciones de estos vidrios-nAg están dentro del campo de los implantes médicos, además de ser biocidas deben ser inocuos para el organismo. La adición de plata puede convertir a estos vidrios en materiales tóxicos para el organismo.

Ya se ha visto en el capítulo 1 que la plata es tóxica para las bacterias y de igual manera las células eucariotas podrían verse afectadas por las nanopartículas de plata.²² La toxicidad de estas nanopartículas sobre las células humanas ha sido estudiada por varios autores.^{22–26} Según Panácek,²⁵ el límite de citotoxicidad para los fibroblastos humanos es de 30mg/L (ppm) para las nanopartículas de plata y de 1mg/L (ppm) para los iones. De este modo, los materiales desarrollados deben liberar al medio una cantidad de nanopartículas inferior a la del límite citotóxico. Para determinar conjuntamente la cantidad de nanopartículas de plata y de iones lixiviados al medio se realizó un análisis químico por ICP de los sobrenadantes obtenidos, tras filtrar y centrifugar los cultivos resultantes al finalizar los ensayos biocidas (según se describió en el capítulo de

materiales y métodos). También se estudió la lixiviación por parte de la sepiolita-nAg y del vitelinato-nAg con objeto de poder compararlos. La cantidad total de nanopartículas e iones de plata lixiviados al medio de cultivo para todas las muestras se ha representado en la tabla 4.14. De esta tabla se deduce que el vitelinato-nAg libera una gran cantidad de plata al medio, por lo que es bastante tóxico. Por tanto, quedan descartados como agentes biocidas la sepiolita-nAg, por no ser activa frente a la levadura, y el vitelinato-nAg, por su toxicidad, quedando los vidrios-nAg obtenidos como materiales idóneos.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	Ag (ppm)		
Sepiolita n-Ag	6,68	6,66	24,18
Vitelinato n-Ag	896,6	1389	829,7
Vidrio n-Ag1	23,27	27,51	24,97
Vidrio n-Ag2	16,71	20,54	13,01

Tabla 4.14: Concentración de plata (ppm) en los sobrenadantes de los cultivos obtenidos tras 48h de ensayo biocida frente a *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis*.

Con el fin de comprobar que la mortandad de los microorganismos no se debe a un pH elevado se determinó el pH del medio (tabla 4.15). Estos valores son muy similares en todos los casos y no sobrepasan los considerados dañinos para los microorganismos (>10).

En la tabla 4.14 puede observarse que la cantidad de plata lixiviada de la sepiolita-nAg y del vidrio-nAg 1 en el cultivo con *I. orientalis* es similar, e incluso, la del vidrio-nAg 2 es menor. Sin embargo, los dos vidrios-nAg son activos frente a *I. orientalis*, y la sepiolita-nAg no presenta actividad. De aquí se deduce que debe haber otro elemento en el vidrio aparte de la plata, que potencie su poder biocida, al igual que ocurría en el caso del hidroxiapatito-nAg estudiado en el capítulo 3. Como ya se comentó en

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	pH		
Sepiolita n-Ag	6,89	6,89	7,55
Vitelinato n-Ag	7,42	7,46	7,00
Vidrio n-Ag 1	8,27	8,38	7,89
Vidrio n-Ag2	8,20	8,09	7,74

Tabla 4.15: Valores de pH de los sobrenadantes de los cultivos obtenidos tras 48h de ensayo biocida frente a *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis*.

dicho capítulo, existen estudios según los cuales el calcio en concentraciones elevadas interfiere en la actividad enzimática, como por ejemplo la de la β -glucasintasa, lo que inhibe el crecimiento de los microorganismos.²⁷ Sin embargo, la concentración concreta de calcio para producir este efecto varía en función del microorganismo.²⁸ Como ya se intuía en el capítulo 3, es posible que exista un efecto sinérgico entre la plata y el calcio, incrementándose notablemente la actividad biocida del material. En la bibliografía existen varios ejemplos de sinergia entre las nanopartículas de plata y otros agentes químicos como los antibióticos. Por ejemplo, Li et al.²⁹ determinó el efecto sinérgico de las nanopartículas de plata combinadas con amoxicilina sobre la bacteria *E. coli*. Fayaz et al.³⁰ estudió el notable incremento en la actividad de varios antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, eritromicina y cloranfenicol con la adición de nanopartículas de plata sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas.

Para comprobar que, efectivamente se libera calcio al medio, se realizó un análisis químico de los sobrenadantes obtenidos tras los ensayos biocidas correspondientes. Los sobrenadantes fueron previamente filtrados y centrifugados para eliminar los restos de los materiales biocidas y de este modo analizar solamente el calcio lixiviado al medio. Los resultados se muestran en la tabla 4.16, donde se observa que la lixiviación de calcio

por parte de los vidrios-nAg es significativamente mayor que la correspondiente a la sepiolita-nAg o al vitelinato-nAg, por lo que se confirma que efectivamente el calcio está jugando un papel importante en la actividad biocida, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos, permitiendo a la plata actuar con mayor eficiencia e incrementando el poder biocida de los vidrios-nAg obtenidos.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	Ca²⁺ (ppm)		
Sepiolita n-Ag	7,62	6,70	7,55
Vitelinato n-Ag	7,57	9,97	7,00
Vidrio n-Ag1	49,42	46,23	7,89
Vidrio n-Ag2	52,73	50,42	7,74

Tabla 4.16: Concentración de Ca²⁺ (ppm) en los sobrenadantes tras 48h de ensayo biocida frente a *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis*.

Para intentar entender mejor el mecanismo de acción de estos vidrios-nAg sobre los microorganismos, se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión sobre los cultivos con *E. coli* JM110 tras 1h de ensayo biocida. En la figura 4.27 se muestra el polvo de vidrio-nAg adherido a la membrana de la bacteria *E. coli*. En las figuras 4.27B, 4.27C y 4.27D se puede observar cómo las nanopartículas de plata ya han penetrado en el citoplasma. De estas micrografías se deduce que las nanopartículas de plata contenidas en el vidrio se van lixiviando lentamente y van introduciéndose en el interior del citoplasma de la bacteria, causando daños irreversibles y su muerte, tal y como se explicó al inicio de este apartado. La lixiviación de calcio conjuntamente con las nanopartículas de plata produce un efecto sinérgico que incrementa notablemente la acción biocida del material. Además, estos materiales son dosificadores de plata, es decir, las nanopartículas se liberan lentamente, por lo que la acción biocida se prolonga en el tiempo y no se llega a alcanzar en ningún caso el límite tóxico para las células humanas.

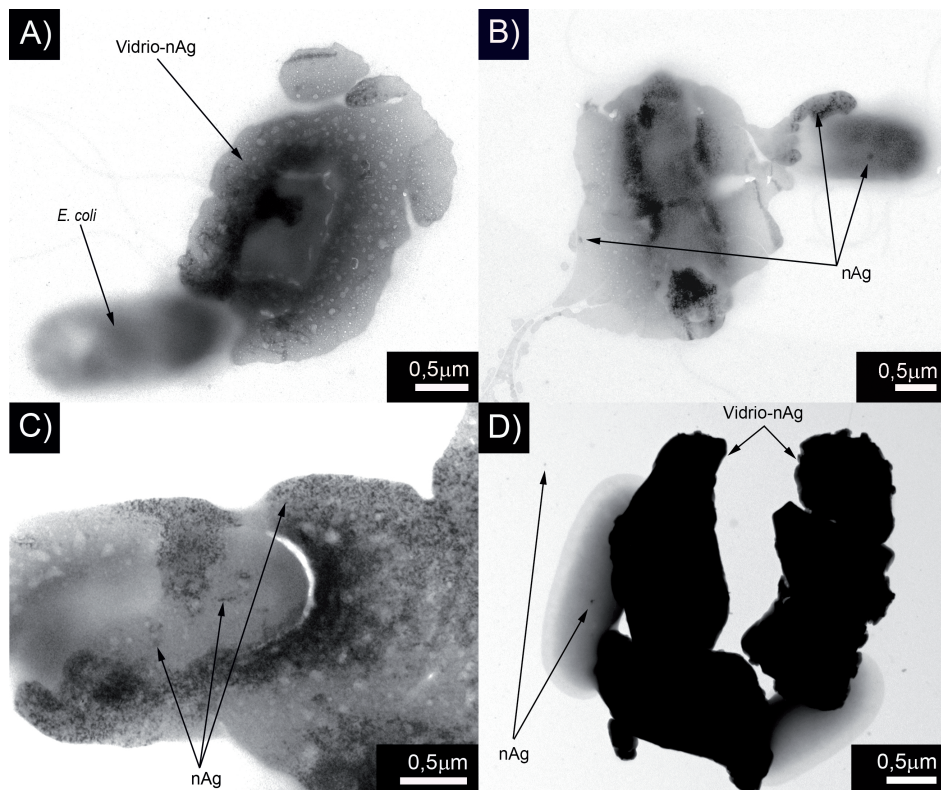


Figura 4.27: Micrografías electrónicas de transmisión tras 1h de ensayo biocida con *E. coli* con polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de: vitelinato-nAg (A y B) y de sepiolita-nAg (C y D).

Finalmente, y para evaluar este efecto, se realizó un estudio de lixiviación de plata durante 60 días siguiendo el método descrito en el apartado 2.21.3 del capítulo de materiales y métodos, para un polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg y con un contenido en plata de $\sim 20\%$ (peso), ya que estos polvos son los que se utilizarán posteriormente para

elaborar los recubrimientos, debido a que se ha demostrado que son biocidas y admiten mayor cantidad de plata que los obtenidos a partir de sepiolita-nAg. Los resultados se representan en la figura 4.28A.

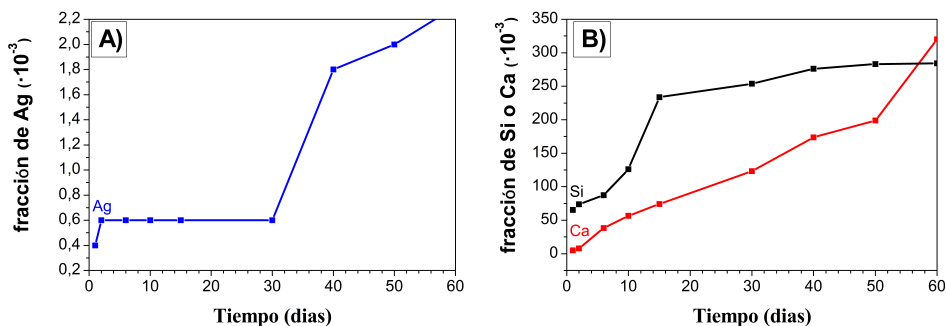


Figura 4.28: (A) Fracción de plata lixiviada por el polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg. (B) Fracciones de silicio y calcio lixiviados por el polvo de vidrio-nAg obtenido a partir de vitelinato-nAg.

De este estudio se puede deducir que las partículas del polvo de vidrio conteniendo n-Ag liberan únicamente una pequeña cantidad de nanopartículas de plata (por ejemplo transcurridos 40 días la fracción de plata lixiviada fue de $1,8 \cdot 10^{-3}$ y transcurridos 60 días fue de $2,3 \cdot 10^{-3}$, lo que les confiere una gran durabilidad. También se analizaron las fracciones de silicio y de calcio lixiviadas por este polvo de vidrio-nAg. Como puede observarse en la figura 4.28B, la lixiviación de las nanopartículas de plata lleva consigo paralelamente la parcial disolución del vidrio.

Para corroborar esta paulatina disolución del vidrio se estudió la microestructura del polvo de vidrio-nAg ($\sim 20\% \text{Ag}$) tras ser sometido durante 60 días a un ensayo de ataque hidrolítico a temperatura ambiente. En la figura 4.29 se muestran las micrografías electrónicas de barrido para polvo de vidrio-nAg ($\sim 20\% \text{Ag}$) antes del ataque hidrolítico (A) y después de dicho ensayo (B), junto con un detalle a mayor

magnificación de una partícula de vidrio (C). En las figuras 4.29B y 4.29C puede apreciarse la aparición de un gran número de microporos ($\sim 220\text{nm}$). Si se comparan estos resultados con las partículas antes del ensayo (figura 4.29A) se puede inferir que ha tenido lugar la disolución parcial del vidrio, siendo el calcio y el silicio los elementos lixiviados en mayor cantidad, según indica el análisis realizado mediante dispersión de energía de Rayos X (EDS). Este análisis muestra un incremento relativo en el porcentaje de plata del vidrio-nAg tras 60 días de ensayo de resistencia hidrolítica hasta alcanzar el 26 % (peso), y una disminución en los porcentajes de calcio y de sílice siendo del 2,1 y del 58,4 (%peso) respectivamente, en relación al vidrio-nAg de partida que contenía (%peso): 20,5 % de Ag; 4,6 % de CaO y 46,50 % de SiO_2 .

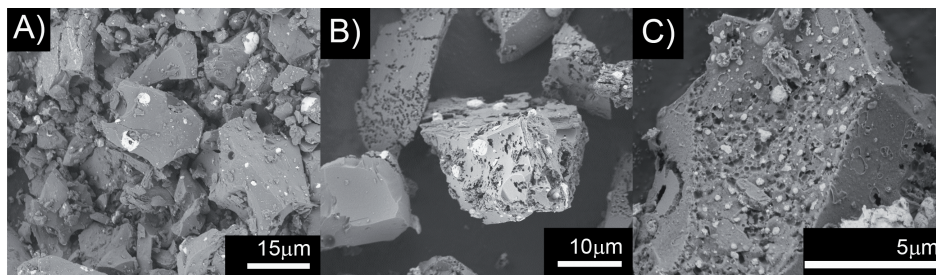


Figura 4.29: Micrografías electrónicas de barrido del polvo de vidrio-nAg: antes del ensayo de resistencia hidrolítica (A), después de 60 días de ensayo de resistencia hidrolítica (B y C).

También se analizó la microestructura del polvo de vidrio-nAg antes y después del ensayo hidrolítico mediante MET (figura 4.30). En las figuras 4.30B y 4.30C puede observarse la pérdida de parte de la estructura vítrea, principalmente los tetraedros de SiO_2 , mostrándose un contorno mucho más anguloso que en el caso del vidrio-nAg de partida (figura 4.30A). Sin embargo, tras el ataque hidrolítico sigue conservándose en la matriz vítrea una fracción considerable de nanopartículas de plata. Como se puede deducir de este análisis, las partículas de vidrio-nAg sufren un

ataque hidrolítico similar al observado por Mello-Castanho et al.³¹ en vidrios sodocálcicos. Es decir, primero se lixivian los elementos alcalinos y alcalinotérreos formándose una capa rica en sílice que se desprende, facilitando con ello que el proceso sea continuo, de manera que las nanopartículas de plata son lixiviadas paulatinamente.

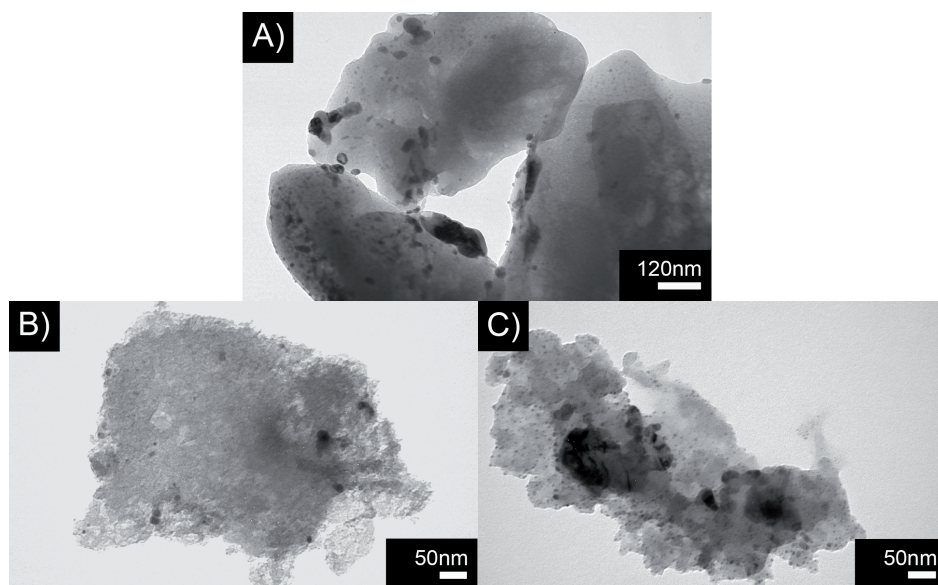


Figura 4.30: Imágenes de MET del polvo de vidrio-nAg antes del ensayo de resistencia hidrolítica (A) y después de 60 días del ensayo (B y C).

4.5. Actividad biocida de nanopartículas de cobre dispersas en una matriz vítrea o incorporadas a la red vítrea

La actividad biocida fue evaluada tanto para las nanopartículas de cobre dispersas en la matriz vítrea como para las que se encuentran

incorporadas a dicha red en forma de Cu^{2+} . También se midió la capacidad biocida de la sepiolita-nCu, con objeto de compararla con el poder biocida de los vidrios con cobre. Los microorganismos empleados fueron: la bacteria gram-negativa *Escherichia coli* JM110, la bacteria gram-positiva *Micrococcus luteus* y la levadura *Issatchenkia orientalis*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y siguiendo el procedimiento de cultivo en medio líquido descrito en el capítulo de materiales y métodos. La cantidad de vidrio-nCu y de vidrio-Cu_{incorporado} añadida a los cultivos fue calculada para obtener una concentración de cobre en los cultivos de 360ppm, con objeto de hacer comparables los resultados con los obtenidos para la plata. De igual modo, se determinó la reducción logarítmica del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cultivo cada 24h, siguiendo la ecuación 4.1. Los resultados obtenidos tras los ensayos biocidas para la sepiolita-nCu, el vidrio-nCu y el vidrio-Cu_{incorporado}, se muestran en la tabla 4.17 en forma de reducción logarítmica de las UFC.

De esta tabla se infiere que el vidrio-nCu es muy activo frente a la bacteria *E. coli*, alcanzando un valor de reducción logarítmica por encima de 6 tras 48h y con una concentración en el cultivo de cobre de 360ppm. Con esta misma concentración frente a *M. luteus* el vidrio-nCu presenta una buena actividad biocida logrando una reducción logarítmica >3 . Por el contrario, únicamente el vidrio-nCu presenta algo de actividad frente a la levadura *I. orientalis* con 360ppm de cobre en el medio de cultivo, aunque no supera una reducción logarítmica de 1. Se especuló sobre la posibilidad de incrementar la actividad biocida si se aumentaba la concentración de cobre en los cultivos. Incrementando la concentración de cobre hasta 540ppm se observó que, tanto la sepiolita-nCu como el vidrio-nCu logran una desinfección segura (reducción logarítmica >4) frente a las bacterias, y el vidrio-Cu_{incorporado} alcanza un logaritmo ~ 3 , lo que se considera una buena actividad biocida tras 48h. Sin embargo, frente a la levadura *I. orientalis* el único material que presenta actividad es el vidrio-nCu.

	Reducción logarítmica de UFC					
	<i>E. coli</i> JM110		<i>M. luteus</i>		<i>I. orientalis</i>	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Sep-nCu (360ppm)	0,76±0,30	0,76±0,30	1,33±0,25	2,07±0,30	0,00±0,15	0,00±0,20
Sep-nCu (540ppm)	6,70±0,32	7,30±0,41	6,97±0,60	7,28±0,50	0,00±0,24	0,15±0,25
Vidrio-nCu (360ppm)	0,76±0,10	8,19±0,15	3,36±0,23	3,64±0,25	0,70±0,15	0,70±0,26
Vidrio-nCu (540ppm)	11,96±0,40	11,96±0,35	5,07±0,22	10,11±0,26	3,58±0,30	4,91±0,40
Sep-nCu _{inc} (360ppm)	0,00±0,20	0,73±0,20	0,0±0,03	1,10±0,35	0,22±0,22	0,00±0,22
Sep-nCu _{inc} (360ppm)	1,12±0,45	2,89±0,40	0,51±0,30	3,10±0,3	0,50±0,30	0,00±0,30

Tabla 4.17: Reducción logarítmica de las unidades formadoras de *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* para: la sepiolita-nCu (360ppm), la sepiolita-nCu (540ppm), el vidrio-nCu (360ppm) el vidrio-nCu (540ppm), el vidrio-nCu_{incorporado} (360ppm) el vidrio-nCu_{incorporado} (540ppm), trascurridas 24 y 48h de ensayo biocida.

4.5.1. Estudio de la toxicidad y del mecanismo de acción biocida de los polvos de vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado} obtenidos

Una vez estudiado el mecanismo de acción biocida para las nanopartículas de plata se intentó dilucidar el mecanismo correspondiente a las nanopartículas de cobre. También se pretendió explicar el mecanismo de acción del vidrio que contenía el cobre incorporado a la matriz y la diferencia en las actividades obtenidas, ya que este vidrio-Cu_{incorporado} presentaba mayor actividad biocida que la sepiolita-nCu, pero menor que el vidrio con el cobre disperso coloidalmente. De igual modo que ocurría con las nanopartículas de plata, el cobre puede ser tóxico para las células

humanas, aunque la concentración requerida para tal efecto es mayor.^{32,33} Según Chen et al.³² la dosis oral de nanopartículas de cobre de tamaño ~23,5nm necesaria para producir la muerte del 50 % de los ratones (LD₅₀) es de 413ppm, lo que se considera una toxicidad moderada, similar a la del polvo de zinc.^{32,34}

Se realizó un análisis químico por ICP de los sobrenadantes obtenidos tras 48h de ensayo biocida para determinar la cantidad de cobre lixiviado al medio. Los resultados de lixiviación se recogen en la tabla 4.18. En esta tabla se aprecia que la sepiolita-nCu lixivia mayor cantidad de cobre que los vidrios, estando próxima al límite de toxicidad, e incluso superándolo en el caso de *E. coli* JM110. Sin embargo, su actividad biocida es inferior a la del vidrio-nCu tras 48h de ensayo biocida sobre *E. coli* JM110 y *M. luteus* para las dos concentraciones estudiadas (tabla 4.17). El caso de la levadura *I. orientalis* es aún más relevante, la sepiolita-nCu, aún liberando mayor cantidad de cobre que el vidrio-nCu, no posee actividad biocida, mientras que el vidrio-nCu (540ppm) logra una desinfección segura con una reducción logarítmica >5.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	Cu (ppm)		
Sepiolita-nCu (360ppm)	351,86	360,0	286,57
Sepiolita-nCu(540ppm)	540,53	406,17	314,90
Vidrio-nCu (360ppm)	148,07	149,50	150,57
Vidrio-nCu (540ppm)	340,29	327,36	241,57
Vidrio-Cu _{inc.} (360ppm)	29,12	28,48	46,09
Vidrio-Cu _{inc.} (540ppm)	30,74	45,76	76,32

Tabla 4.18: Concentración de cobre (ppm) en los sobrenadantes de los cultivos obtenidos tras 48h de ensayo biocida frente a *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis*.

También existen estudios sobre los efectos sinérgicos entre el cobre y

diferentes agentes químicos. Harrison et al. observó que la combinación de cobre y los cationes cuaternarios de amonio aumentaban sinérgicamente la actividad biocida frente a *Pseudomonas aeruginosa*.³⁵ Grytten et al. determinó el efecto sinérgico antibacteriano frente a *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguis* al combinar el cobre con hexetidina.³⁶ Para corroborar el posible efecto sinérgico producido por el calcio se realizó un análisis químico de la cantidad de calcio lixiviada al cultivo. Los resultados (tabla 4.19) reflejan que los vidrios lixivian mayor cantidad de calcio que la sepiolita-nCu. De este modo queda demostrado dicho efecto sinérgico, ya que el vidrio-nCu con menor cantidad lixiviada de cobre que la sepiolita-nCu logra una mayor actividad biocida. Por otra parte, la diferencia entre las actividades de los dos tipos de vidrio se debe a la baja lixiviación de cobre por parte del vidrio-Cu_{incorporado}, que es insuficiente para obtener una actividad biocida aceptable.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	Ca ²⁺ (ppm)		
Sepiolita-nCu (360ppm)	4,72	6,18	3,10
Sepiolita-nCu(540ppm)	17,02	13,12	7,86
Vidrio-nCu (360ppm)	25,83	52,86	86,14
Vidrio-nCu (540ppm)	39,76	38,76	89,71
Vidrio-Cu_{inc.} (360ppm)	27,34	12,98	41,30
Vidrio-Cu_{inc.} (540ppm)	29,29	48,56	105,70

Tabla 4.19: Concentración de calcio (ppm) en los sobrenadantes de los cultivos obtenidos tras 48h de ensayo biocida frente a *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis*.

Los valores de pH correspondientes a los sobrenadantes de los cultivos (tabla 4.20) no sobrepasan los considerados dañinos para los microorganismos, de modo que la mortandad no es debida al incremento de pH.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
	pH		
Sepiolita-nCu (360ppm)	8,28	6,78	7,08
Sepiolita-nCu(540ppm)	8,00	7,50	6,50
Vidrio-nCu (360ppm)	9,18	9,23	8,64
Vidrio-nCu (540ppm)	9,19	8,25	8,69
Vidrio-Cu _{inc.} (360ppm)	8,70	8,78	7,70
Vidrio-Cu _{inc.} (540ppm)	9,0	9,1	8,15

Tabla 4.20: pH de los sobrenadantes de los cultivos obtenidos tras 48h de ensayo biocida.

Con el fin de dilucidar el mecanismo de acción de las nanopartículas de cobre sobre los microorganismos, se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión tras 0, 30 y 90 minutos de ensayo biocida sobre *E. coli* JM110, empleando polvo de vidrio-nCu de tamaño $<0,45\mu\text{m}$ y con una concentración en los cultivos de 540ppm. La secuencia de micrografías obtenidas se muestra en la figura 4.31. De esta serie de micrografías se deduce que en una primera etapa (30min) la acción biocida es debida a que el polvo de vidrio-nCu se adhiere a la bacteria, produciéndose un contacto directo entre las nanopartículas de cobre contenidas en el vidrio y la membrana de la bacteria. En una segunda etapa (90min), las nanopartículas de cobre metálico liberadas por la disolución parcial de la interfase vidrio-nanopartícula ya han penetrado en el citoplasma, causando daños en las células. Se ha podido comprobar la existencia de cobre metálico en el interior de las bacterias (es decir, no se ha oxidado) puesto que el Cu^{2+} no presenta contraste y no puede observarse mediante microscopía electrónica de transmisión. Hasta la fecha no se ha mostrado una micrografía como la de la figura 4.31, donde claramente se observan las nanopartículas de cobre metálico en el interior del citoplasma de la bacteria. Este hecho también fue corroborado por la coloración roja del

sobrenadante obtenido a partir de los cultivos tras los ensayos biocidas, según se muestra en la figura 4.32, indicando que la acción biocida del vidrio-nCu es debida a las nanopartículas metálicas de cobre y no a los iones. Por el contrario, en el caso del vidrio-Cu_{incorporado} no se observaron nanopartículas de cobre metálico en la microscopía de transmisión y la coloración del sobrenadante fue azul (típica del Cu²⁺), debido a que el cobre se oxida al incorporarse a la red vítrea (figura 4.30). De este modo la actividad biocida se debe enteramente al Cu²⁺, que al estar incorporado a la red vítrea se lixivia en menor cantidad y por ello, la actividad obtenida es menor.

De igual manera que en los vidrios-nAg, la lixiviación conjunta de calcio y cobre produce un efecto sinérgico, incrementándose significativamente la acción biocida y logrando una desinfección segura, incluso para *I. orientalis*. Estos vidrios con cobre presentan otra ventaja añadida, y es que son dosificadores de cobre, de modo que la acción biocida es más duradera y no se alcanzan los límites de citotoxicidad.

El número de trabajos publicados sobre la actividad biocida de las nanopartículas de cobre es inferior al destinado a las de plata. Además, existe cierta controversia sobre la eficacia biocida de las nanopartículas de plata y de cobre, ya que no siempre la plata es la más eficaz, dependiendo del microorganismo. Por ejemplo, Ruparelia et al. estudiaron tres tipos de bacterias diferentes que mostraban distintas sensibilidades a la plata y el cobre. *E. coli* resultó ser mucho más sensible a la plata que *Staphylococcus aureus*, y *Bacillus subtilis* presentó mayor sensibilidad al cobre.³⁷

Bajo las condiciones experimentales y con los microorganismos empleados en este estudio, se deduce que las nanopartículas de plata son más efectivas, ya que alcanzan una desinfección segura con menor lixiviación de nanopartículas al medio. Por otra parte, el cobre es menos tóxico (presenta toxicidad moderada) y es más barato por lo que el uso de los vidrios con nanopartículas de plata o cobre dependerá de las aplicaciones a las que sean destinados.

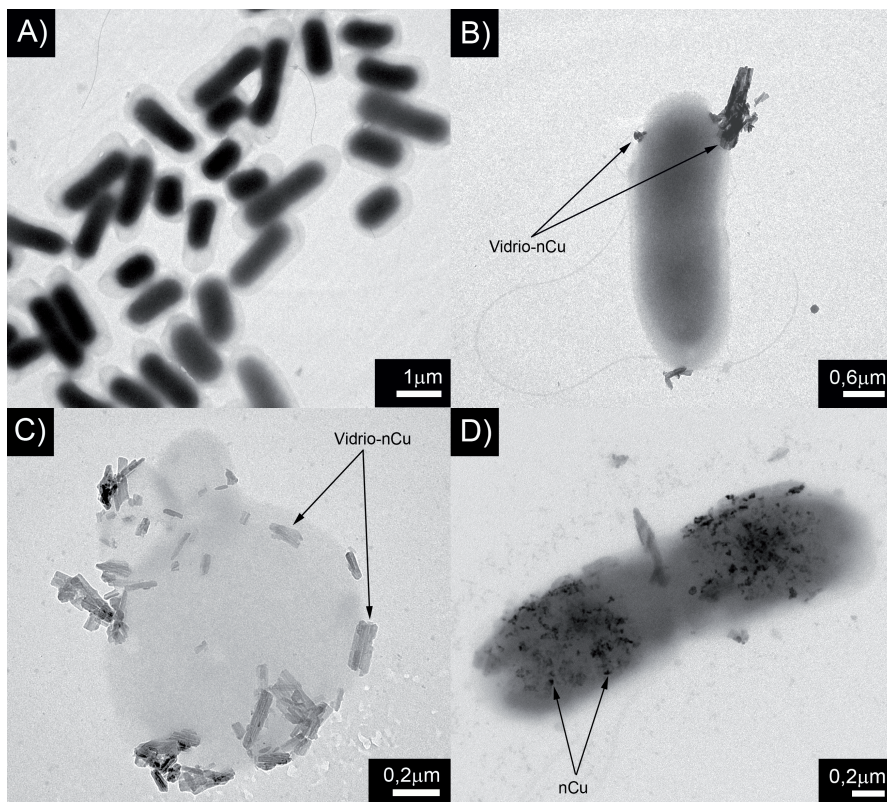


Figura 4.31: Micrografías de electrónicas de transmisión de cultivos de *E. coli* con polvo de vidrio-nCu tras 0min (A), 30min (B y C) y 90min (D) de ensayo.



Figura 4.32: Imágenes de los sobrenadantes tras 48h de ensayo con *E. coli* JM110 para polvo de vidrio-nCu (izda.) y polvo de vidrio-Cu_{inc.} (dcha.).

4.6. Bibliografía

1. GW Morey, NL Bowen. Ternary system sodium metasilicate-calcium metasilicate-silica. J. Soc. Glass Technol. 1925;9:226-264.
2. A Angiolani. Introducción a la Química Industrial. Santiago de Chile: Andrés Bello; 1960.
3. C Pecharromán, A Esteban-Cubillo, I Montero, JS Moya et al. Monodisperse and corrosion-resistant metallic nanoparticles embedded into sepiolite particles for optical and magnetic applications. J. Am. Ceram. Soc. 2006;89(10):3043-3049.
4. S Kawata, Y Inouye, T Kataoka, T Okamoto. Capítulo: "Local plasmon in a metallic nanoparticle". Kawata S, Ohtsu S, Irie M, editors. Nano-Optics. Germany: Springer; 2002. p 76-87.
5. U Kreibig, CV Fragstein. The limitation of electron mean free path in small silver particles. Z. Phys. 1969;224(4):307-323.
6. U Kreibig, M Vollmer. Optical properties of metal clusters. Berlin: Springer; 1995.
7. FW Reynolds, GR Stilwell. Mean free paths of electrons in evaporated metal films. Phys. Rev. 1952;88(2):418-419.
8. T Senoy, KN Saritha, EMA Jamal, SH Al-Harhi et al. Size-dependent surface plasmon resonance in silver silica nanocomposites. Nanotechnology 2008(7):075710.
9. B Palpant. Capítulo: "Third order non-linear optical response of metal nanoparticles". Papadoulus MG, Sadlej A, Leszczynski J, editors. Non-linear optical properties of matter. Netherlands: Springer; 2006. p 461-508.
10. CF Bohren, DR Huffman. Adsorption and scattering of light by small particles. New York: Wiley; 1983.

11. M Kerker. The scattering of light and other electromagnet radiation. New York: Academic Press; 1969. 150-178 p.
12. A Esteban-Cubillo, C Díaz, A Fernández, LA Díaz et al. Silver nanoparticles supported on [alpha]-, [eta]- and [delta]-alumina. J. Eur. Ceram. Soc. 2006;26(1-2):1-7.
13. G Mie. Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions. Annalen der Physik 1908;25(3):377-445.
14. RH Magruder, H R.F., L Yang, JE Wittig et al. Physical and optical properties of Cu nanoclusters fabricated by ion implantation in fused silica. J. Appl. Phys. 1994;76(2):708-715.
15. C Salzemann, J Lermé, J Urban, I Lisiecki. Is it possible to correlate a collection of copper nanocrystals with their optical response? Chem. Mater. 2005;17(6):1279-1283.
16. JL Duan, TW Cornelius, J Liu, S Karim et al. Surface plasmon resonances of Cu Nanowire Arrays. J. Phys. Chem. C 2009;113(31):13583-13587.
17. P Miranzo. Comportamiento mecánico de los materiales cerámicos tenaces multifásicos obtenidos por sinterización reactiva. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 1985.
18. JMF Navarro. Capítulo: "El Estado vitreo y la estructura de los vidrios". Consejo Superior de Investigaciones Científicas, editor. El vidrio. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991. p 492-505.
19. JMF Navarro. Capítulo: "El Estado vitreo y la estructura de los vidrios". Consejo Superior de Investigaciones Científicas, editor. El vidrio. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991. p 83-91.

20. E Plumat. La formation de systèmes pseudo-vitreux et pseudo-cristallins. *Silic. Industr.* 1967;32:5-13.
21. USEPA (EPA). National Primary Drinking Water Regulations.
22. C Marambio-Jones, E Hoek. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanopart. Res.* 2010;12(5):1531-1551.
23. PV AshaRani, GLK Mun, MP Hande, S Valiyaveetil. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;3:279-90.
24. C Carlson, SM Hussain, AM Schrand, LK Braydich-Stolle et al. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B* 2008;112:13608–13619.
25. A Panacek, M Kolar, R Vecerova, R Prucek et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida spp.* *Biomaterials* 2009;30(31):6333-40.
26. V Alt, T Bechertb, P Steinruckeb, M Wagenerc et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004;25(18):4383-4391.
27. CO Chardonnet, CE Sams, WS Conway. Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 1999;52(6):967-973.
28. S Droby, ME Wisniewski, L Cohen, B Weiss et al. Influence of CaCl_2 on *Penicillium digitatum*, Grapefruit Peel Tissue, and Biocontrol Activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 1997;87(3):310-315.

29. P Li, J Li, C Wu, Q Wu et al. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles Nanotechnology 2005;16(9):1912-1917.
30. AM Fayaz, K Balaji, M Girilal, R Yadav et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med 1010;6(1):103-109.
31. SRH Mello-Castanho, AC da Silva, A Esteban-Cubillo, C Pecharromán et al. Vidrios de silicato a partir de residuos galvánicos con alto contenido en Cr y Ni. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio 2006;45(1).
32. Z Chen, H Menga, G Xing, C Chena et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. Toxicol. Lett. 2006;163(2):109-120.
33. A Schrand, M Rahman, S Hussain, J Schlager et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. WIREs Nanomed. and nanobiotechnol. 2010;2(5):544-568.
34. H Suzuki, T Toyooka, Y Ibuki. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis Environ. Sci. Technol. 2007;41:3018-3024.
35. JJ Harrison, RJ Turner, DA Joo, MA Stan et al. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 2008;52(8):2870-2881.
36. J Grytten, AA Scheie, E Giertsen. Synergistic antibacterial effects of copper and hexetidine against *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguis*. Acta Odontol. Scand. 1988;46(3):181-183.

37. JP Ruparelia, AK Chatterjee, SP Duttagupta, S Mukherji. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 2008;4(3):707-716.

Capítulo 5

Recubrimientos biocidas sobre materiales cerámicos oxídicos

En este capítulo se va abordar al estudio de recubrimientos biocidas sobre diferentes sustratos cerámicos y sobre un vidrio, realizados a partir de polvos de vidrio-nAg, vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado}, con un contenido de nanopartículas de plata o cobre de hasta $\sim 20\%$ (%peso) en todos los casos.

Para evitar la modificación de la fase vítrea, los recubrimientos de vidrio-nAg se obtuvieron a partir de vitelinato-nAg. Se ha evitado usar sepiolita-nAg, porque para alcanzar un contenido de $\sim 20\%$ de nAg, la incorporación de sílice a la fase vítrea proveniente de la sepiolita sería muy elevada, y esto incrementaría notablemente la temperatura de sinterización del polvo vítreo. Por otra parte, la adición al vidrio de sílice provocaría la disminución relativa en la proporción de óxidos modificadores de la fase vítrea, lo que también propiciaría un incremento en la temperatura de sinterización y un aumento de la viscosidad del vidrio. De esta forma se pudo utilizar este vidrio-nAg ($\sim 20\%$) para

recubrir la aleación de 90Ti-6Al-4V, que tiene limitada la temperatura de tratamiento por razones estructurales. En el caso del vidrio-nCu se utilizó la sepiolita-nCu debido a que solo se aplica a los recubrimientos sobre óxidos cerámicos que no poseen limitación alguna en la temperatura de tratamiento.

5.1. Obtención de recubrimientos biocidas sobre materiales cerámicos oxídicos

Los sustratos seleccionados fueron alúmina, circonita, y vidrio de ventana. La alúmina empleada posee 99,9% de pureza, 99% de densidad teórica y es de grado biomédico. La circonita utilizada (Ce-TZP/nAl₂O₃) es un compuesto nanoestructurado con 99% de densidad teórica, de grado biomédico y con la siguiente composición química (%peso): 65,20% ZrO₂; 8,55% CeO₂ y 24,88% Al₂O₃. Ambos sustratos fueron suministrados por Nanoker S. L. El vidrio elegido fue suministrado por Cristalerías Mataró S. L. y su composición corresponde a la de un vidrio sodocálcico, según se indica a continuación (%peso): 73,2% de SiO₂; 13,22% de Na₂O; 10,62% de CaO; 0,03% de MgO; 1,51% de Al₂O₃; 1,12% de K₂O y 0,2% de SO₃.

La alúmina y la circonita fueron seleccionadas por sus aplicaciones en implantes médicos (implantes dentales, de cadera o de rodilla entre otros),¹⁻³ así como en las industrias farmacéutica y alimentaria.⁴⁻⁷ Por su parte el sustrato de vidrio fue elegido por sus aplicaciones en hospitales, interruptores de luz o envases.

Los distintos recubrimientos biocidas se realizaron siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

1. Obtención de los polvos de vidrio-nAg, vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado}, según se describió en el capítulo 4, con un tamaño de partícula inferior a 32μm y un contenido en plata o cobre

del 20% (%peso).

2. Decantación de los polvos de vidrio obtenidos (0,2g) a partir de una suspensión homogénea en acetona (20mL).
3. Secado en aire a 40°C en estufa.
4. Sinterización de los recubrimientos a 10°C/min en atmósfera de: (i) argón para los recubrimientos de vidrio-nCu y (ii) aire para los recubrimientos de vidrio-nAg y de vidrio-Cu_{incorporado}.

La temperatura final de sinterización de cada recubrimiento depende de su composición y fue determinada por las microscopías de calefacción. En todos los ensayos se utilizó una placa de alúmina como sustrato. Los puntos fijos de viscosidad (punto de deformación, media esfera y fluidez) correspondientes al vidrio-nAg, vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado} están representados en la figura 5.1A, B y C, respectivamente.

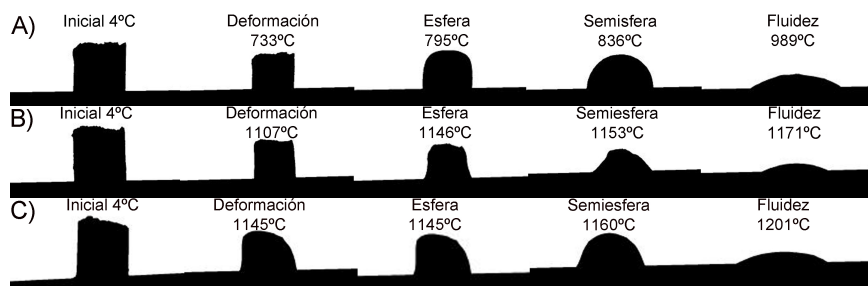


Figura 5.1: Puntos fijos de viscosidad para: (A) polvo de vidrio-nAg (20%Ag), (B) polvo de vidrio-nCu (20%Cu) y (C) polvo de vidrio-Cu_{incorporado} (20%Cu).

De estas microscopías de calefacción se deduce que el recubrimiento con polvo de vidrio-nAg debe realizarse a una temperatura >733°C y los recubrimientos con vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado} a una temperatura >1150°C. Los recubrimientos con cobre también se realizaron a una temperatura menor, 850°C, debido a que el punto de deformación del sustrato de vidrio está ~1000°C.

5.2. Caracterización de los recubrimientos

Los recubrimientos obtenidos fueron caracterizados mediante análisis químico, difracción de Rayos X, espectroscopía UV-vis y microscopías óptica, electrónica de barrido y electrónica de transmisión.

5.2.1. Análisis químico

En las siguientes tablas se recogen los análisis químicos (%peso) de los recubrimientos. La composición química del vidrio-nCu y del vidrio-Cu_{incorporado} es la misma ya que solo difiere la atmósfera en la que fueron sinterizados.

Vidrio-nAg a partir de vitelinato-nAg									
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SO ₃	Ag
46,50	4,60	18,10	1,83	0,03	1,02	1,00	0,17	0,44	20,50

Tabla 5.1: Análisis químico del recubrimiento de vidrio-nAg.

Vidrio-nCu y vidrio-Cu _{incorporado} a partir de Sepiolita-nCu								
SiO ₂	CaO	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	Al ₂ O ₃	B ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Cu
52,99	1,66	5,64	14,58	2,40	1,27	0,23	0,43	20,08

Tabla 5.2: Análisis químico de los recubrimientos de vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado}.

5.2.2. Difracción de Rayos X y Espectroscopía UV-visible

Los difractogramas de Rayos X y los espectros de absorción UV-vis de los recubrimientos de vidrio-nAg, vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado} se representan en las figuras 5.2A, B y C, respectivamente.

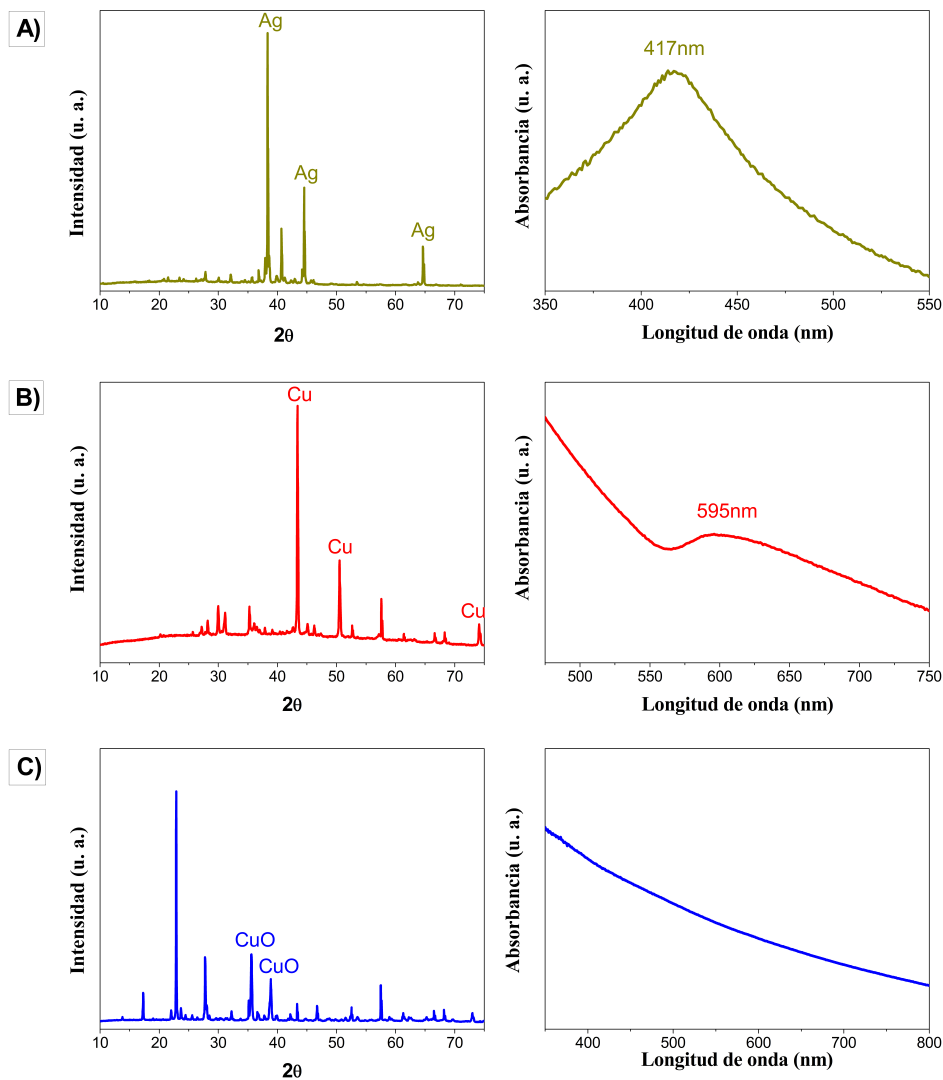


Figura 5.2: Difracción de Rayos X y espectros de absorción UV-vis para: recubrimiento de vidrio-nAg (A), recubrimiento de vidrio-nCu (B) y recubrimiento de vidrio-Cu_{incorporado} (C).

En el difractograma de Rayos X del recubrimiento de vidrio-nAg se aprecian las difracciones de Bragg correspondientes a la plata metálica (JCPDS: 87-0720) y en el difractograma del vidrio-nCu aparecen las correspondientes al cobre metálico (JCPDS: 85-1326).

En el caso del vidrio-Cu_{incorporado} se observan las difracciones de Bragg del CuO (JCPDS: 44-706) debido a la sinterización en atmósfera oxidante. Estos resultados son consistentes con los espectros de absorción UV-vis obtenidos, ya que en el caso de los recubrimientos con vidrio-nAg y con vidrio-nCu aparecen máximos de absorción debidos a la resonancia del plasmón de superficie de la plata o del cobre localizados a ~ 417 y ~ 595 nm, respectivamente. Por el contrario, en el caso del vidrio-Cu_{incorporado} no se aprecia ningún máximo de absorción.

Los recubrimientos con cobre a 850°C y a 1150°C presentan difracciones de Rayos X y espectroscopías UV-vis similares, por lo que el incremento de la temperatura no ha afectado al estado de oxidación del cobre ni a su distribución de tamaño de partícula.

Por último, el resto de picos de difracción observados corresponden a compuestos sodocálcicos que aparecen en mayor proporción en el caso del recubrimiento con vidrio-Cu_{incorporado}, debido a la incorporación del cobre a la red vítrea, según se explicó previamente durante el capítulo 4, en el apartado de caracterización de los polvos de vidrio obtenidos.

5.2.3. Caracterización microestructural

La caracterización microestructural de los recubrimientos obtenidos sirvió para determinar la morfología, distribución y tamaño de las nanopartículas en la matriz vítrea, y la naturaleza de la interfase/recubrimiento.

5.2.3.1. Microscopía óptica

Mediante la microscopía óptica de luz reflejada se analizaron las microestructuras de los recubrimientos, las distintas fases formadas y la posible aparición de grietas y heterogeneidades. En las figuras 5.3A, B y C se muestran las imágenes para los recubrimientos con vidrio-nAg sobre substratos de α -alúmina, Ce-TZP/ nAl_2O_3 y vidrio, respectivamente.

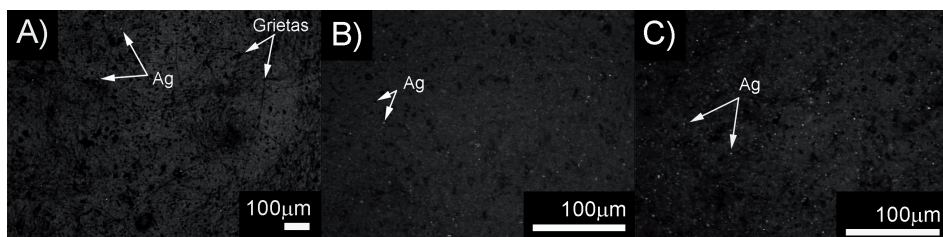


Figura 5.3: Imágenes de microscopía óptica de los recubrimientos con vidrio-nAg sobre substratos de: α -alúmina (A), Ce-TZP/ nAl_2O_3 (B) y vidrio (C).

En la figura 5.3 se observa cierta porosidad en los recubrimientos así como pequeños aglomerados de plata, homogéneamente distribuidos, con un tamaño entre ~ 1 y $5\mu\text{m}$. Únicamente se produjo agrietamiento del recubrimiento cuando se usó α -alúmina como substrato. La aparición de grietas se debe a la diferencia en los coeficientes lineales de expansión térmica (α) del substrato y del recubrimiento. Por este motivo, se realizó una dilatometría tanto de los substratos utilizados como del polvo de vidrio-nAg empleado para fabricar los recubrimientos.

Los resultados se recogen en la tabla 5.3. De esta tabla se desprende que la diferencia entre los coeficientes de expansión térmica del vidrio-nAg y de la α -alúmina es notablemente elevada ($\Delta\alpha=3,5\cdot 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$). Al ser el coeficiente de expansión térmica para la alúmina menor que el del vidrio-nAg, el recubrimiento se encuentra sometido a tracción, lo cual favorece la aparición de grietas, explicándose de este modo las imágenes

obtenidas. En los recubrimientos de Cu no se produjo agrietamiento, debido a que la diferencia en los coeficientes de expansión térmica no es lo suficientemente elevada (tabla 5.3).

$\alpha_{10-800} (^{\circ}\text{C}^{-1})$	
Polvo de Vidrio n-Ag	$11 \cdot 10^{-6}$
Polvo de vidrio n-Cu	$9,9 \cdot 10^{-6}$
Polvo de vidrio-Cu_{incorporado}	$10,6 \cdot 10^{-6}$
α-alúmina	$7,5 \cdot 10^{-6}$
Ce-TZP/nAl₂O₃	$12 \cdot 10^{-6}$
Vidrio	$9 \cdot 10^{-6}$

Tabla 5.3: Coeficientes lineales de expansión térmica (10-800°C) para los polvos de vidrio-nAg, vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado} y para los sustratos de α -alúmina, Ce-TZP/nAl₂O₃ y vidrio.

En la figura 5.4 se muestran las imágenes de microscopía óptica para los recubrimientos con vidrio-nCu en atmósfera de argón: a 850°C sobre sustrato de Ce-TZP/nAl₂O₃ (A), a 850°C sobre sustrato de vidrio (B) y a 1150°C sobre α -alúmina (C). A su vez, las figuras 5.4D, E y F recogen las imágenes de los recubrimientos en atmósfera de aire: a 850°C sobre sustrato de Ce-TZP/nAl₂O₃ (D), 850°C sobre vidrio (E) y 1150°C sobre α -alúmina (F). En las micrografías ópticas de los recubrimientos con vidrio-nCu puede apreciarse el color rojo rubí característico de las nanopartículas de cobre metálico, lo que concuerda con el espectro de absorción y con las difracciones de Rayos X. También aparecen algunos pequeños aglomerados de cobre de entre ~ 1 y $5\mu\text{m}$. Por otra parte, los recubrimientos realizados a 850°C tanto en atmósfera de aire como de argón presentan una elevada porosidad abierta que se analizará en mayor profundidad en el estudio de microscopía electrónica de barrido. Por último, en la figura 5.4F se observan cristales de silicatos sodocálcicos que precipitan como consecuencia de la incorporación de Cu²⁺ a la red vítrea, y que fueron previamente detectados mediante difracción de Rayos X.

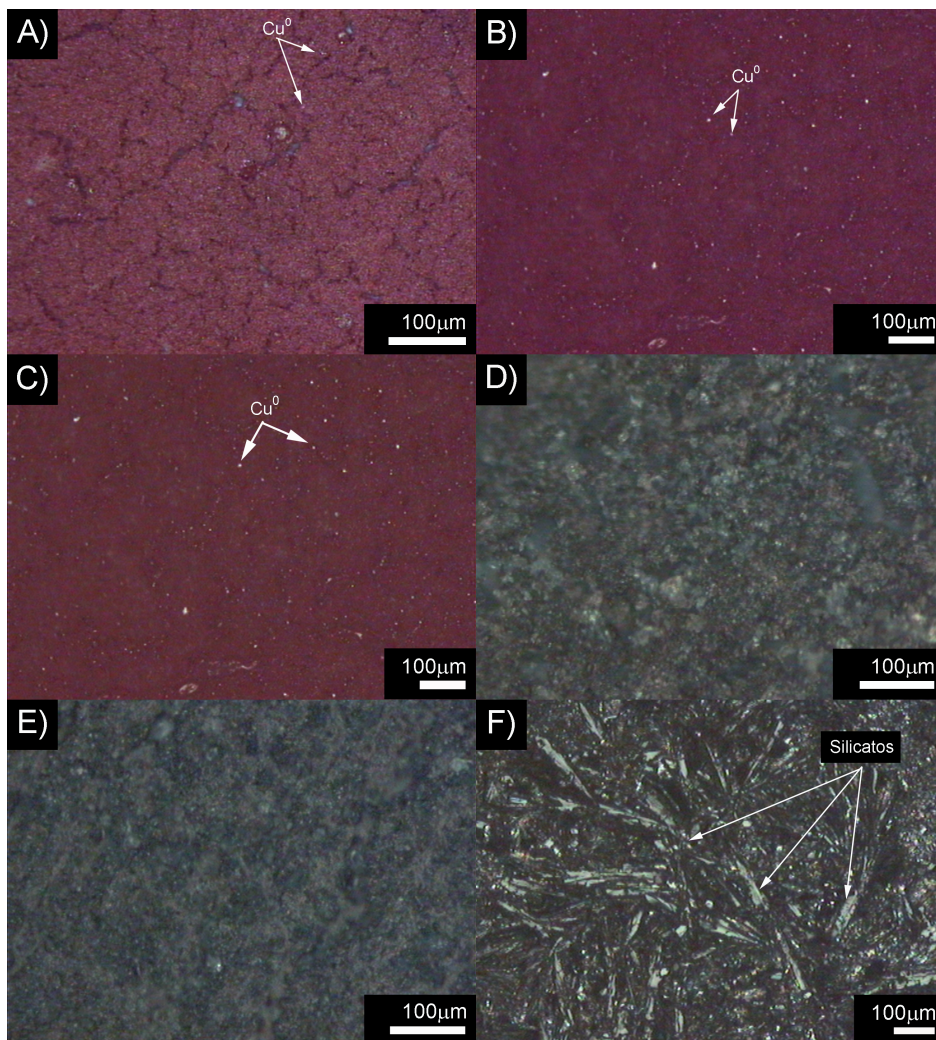


Figura 5.4: Imágenes de microscopía óptica de los recubrimientos con vidrio-nCu a: 850°C sobre Ce-TZP/ nAl_2O_3 (A) y vidrio (B) y a 1150°C sobre α -alúmina (D); y de los recubrimientos con vidrio-Cu_{incorporado} a: 850°C sobre Ce-TZP/ nAl_2O_3 (D), vidrio (E) y 1150°C sobre α -alúmina (F).

Es importante mencionar, que no se han encontrado estudios sobre vidrios sodocálcicos con elevados contenidos de CuO en la literatura, por lo que no se dispone de datos termodinámicos sobre las relaciones de equilibrio de fases para el caso concreto de la composición vidrio-Cu (20 %), en el margen de temperaturas estudiadas.

5.2.3.2. Microscopía electrónica de barrido

En la figura 5.5 se muestran las micrografías electrónicas de barrido de los polvos de vidrio-nAg (A), vidrio-nCu (B) y vidrio-Cu_{incorporado} (C).

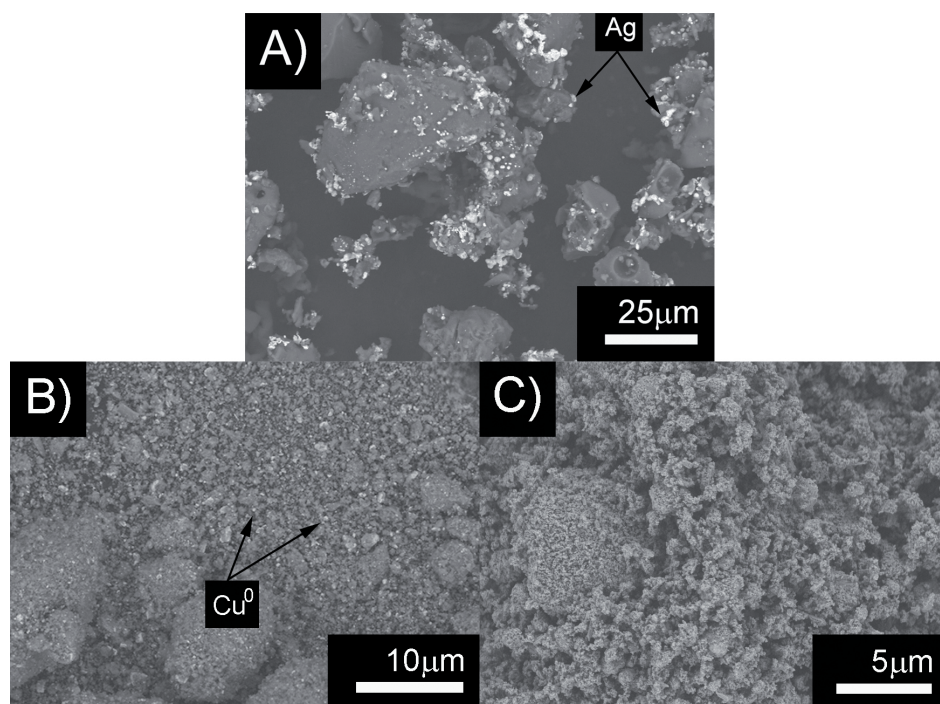


Figura 5.5: Micrografías electrónicas de barrido para los polvos de: vidrio-nAg (A), vidrio-nCu (B) y vidrio-Cu_{incorporado} (C).

Se observan algunos aglomerados de plata (A) y cobre (B) de tamaño que varía entre ~ 1 y $5\mu\text{m}$, previamente detectados mediante microscopía óptica. En la figura 5.5C no aparece cobre metálico ya que se ha incorporado como Cu^{2+} a la red vítrea. En cambio, sí que se observan en ambas micrografías (figuras 5.4B y C) algunas fibras de sepiolita que no han sido incorporadas completamente a la red vítrea. Esto es consecuencia de la elevada cantidad de sepiolita-nCu añadida al vidrio (77,2%) y de las bajas temperaturas de tratamiento.

También se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido tanto de la superficie de los recubrimientos como de la interfase recubrimiento/substrato para todos los recubrimientos (figuras 5.6, 5.7 y 5.8). Las micrografías correspondientes a la superficie del recubrimiento de vidrio-nAg y su interfase con el substrato de Ce-TZP/ nAl_2O_3 aparecen en las figuras 5.6A y B, respectivamente. En ellas pueden apreciarse las nanopartículas de plata distribuidas uniformemente en la matriz vítrea, y algunos aglomerados de entre ~ 1 y $5\mu\text{m}$, que ya habían sido observados en el polvo de vidrio-nAg empleado para hacer el recubrimiento (figura 5.5). El resultado obtenido para el substrato de alúmina fue similar.

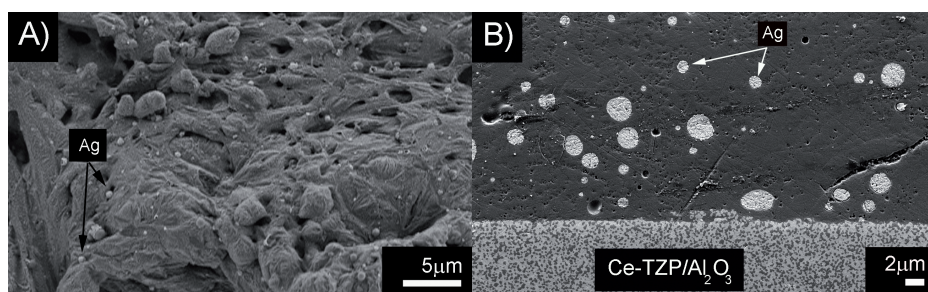


Figura 5.6: Micrografías electrónicas de barrido de la superficie del recubrimiento de vidrio-nAg sobre el substrato de Ce-TZP/ nAl_2O_3 (A) y de la interfase vidrio-nAg con Ce-TZP/ nAl_2O_3 .

En la figura 5.7 se recogen las micrografías electrónicas de barrido de la superficie del recubrimiento de vidrio-nCu sobre los substratos empleados.

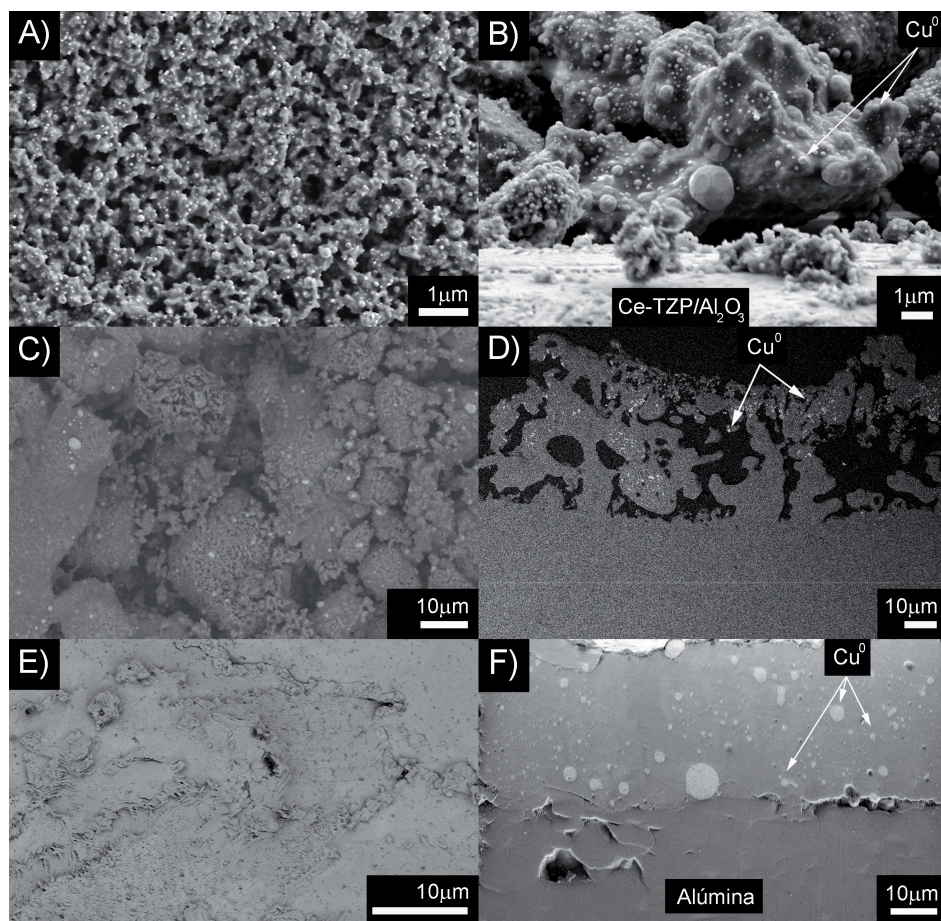


Figura 5.7: Micrografías electrónicas de barrido de: la superficie del recubrimiento de vidrio-nCu sobre substrato de Ce-TZP/ $n\text{Al}_2\text{O}_3$ a 850°C (A), vidrio a 850°C (C) y α -alúmina a 1150°C (E); y las interfaces vidrio-nCu con: Ce-TZP/ $n\text{Al}_2\text{O}_3$ a 850°C (B), vidrio a 850°C (D) y con α -alúmina a 1150°C (F).

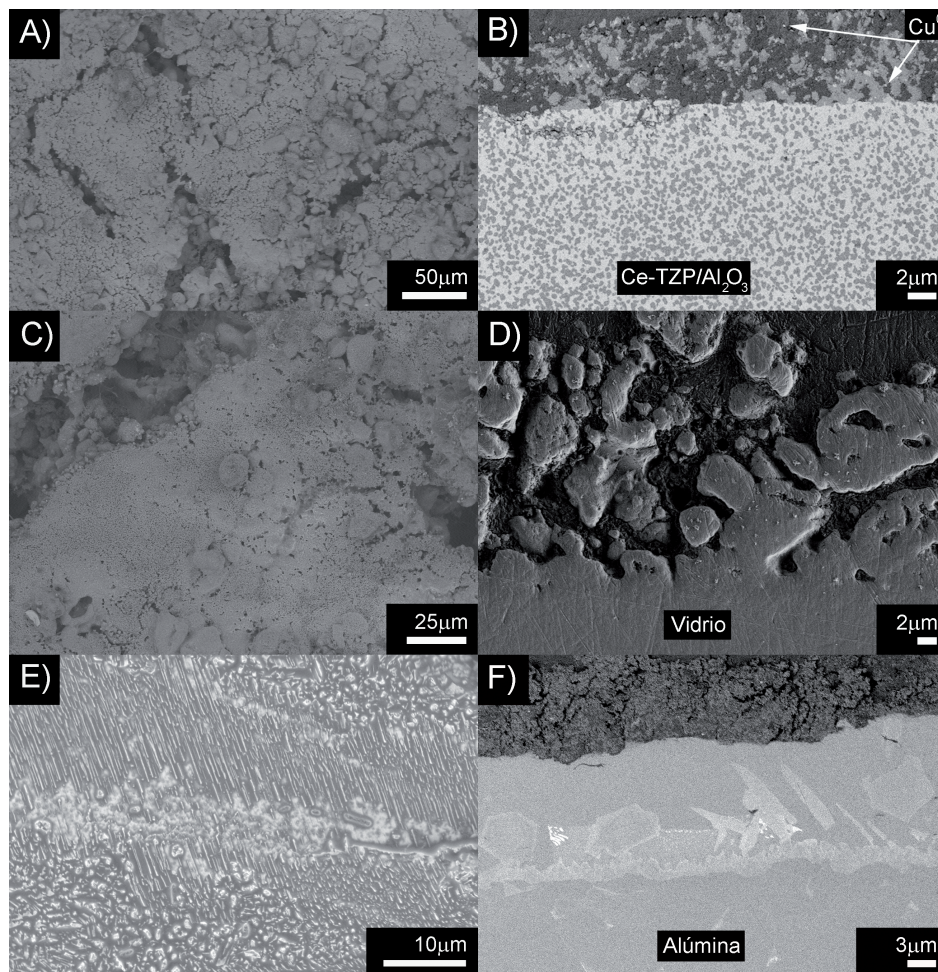


Figura 5.8: Micrografías electrónicas de barrido de los recubrimientos de vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$ sobre: Ce-TZP/ nAl_2O_3 a 850°C (A), vidrio a 850°C (C) y α -alúmina a 1150°C (E); y las interfaces vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$ con: Ce-TZP/ nAl_2O_3 a 850°C (B), vidrio a 850°C (D) y α -alúmina a 1150°C (F).

En todos los recubrimientos de vidrio-nCu, se observan nanopartículas de

cobre metálicas homogéneamente distribuidas en la matriz vítrea y algunos pequeños aglomerados procedentes del polvo de vidrio-nCu de partida (figura 5.5B). Por otra parte, debido al incremento en el contenido de sílice en la fase vítrea respecto al vidrio-nAg (61,62 % frente a 46,5 %), y a la disminución en el contenido de óxidos modificadores de ésta, los recubrimientos obtenidos a 850°C presentan una elevada porosidad abierta (~40 %). De este modo, para obtener un recubrimiento con baja porosidad es necesario elevar la temperatura de sinterización hasta 1150°C (figuras 5.7E y F). Sin embargo, esto no es posible en caso de utilizar vidrio como sustrato, ya que posee un punto de deformación ~800°C.

Por último, en la figura 5.8 se recogen las micrografías electrónicas de barrido de la superficie de los recubrimientos con vidrio-Cu_{incorporado}. Los recubrimientos obtenidos a 850°C tanto sobre Ce-TZP/nAl₂O₃ como sobre vidrio poseen una elevada porosidad, igual que sucedía con los de vidrio-nCu obtenidos en atmósfera de argón. Igualmente, a mayor temperatura (1150°C) se vuelve a obtener un recubrimiento prácticamente libre de poros, como puede verse en la figura 5.8E. En dicha figura también puede apreciarse la texturación de los silicatos formados y su tendencia a precipitar en mayor cantidad cerca de la interfase (figura 5.8F), ya que posiblemente la superficie del sustrato de α -alúmina facilita su nucleación y texturación.

5.2.3.3. Microscopía electrónica de transmisión

Se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión con objeto de determinar el tamaño y la distribución de tamaño de las nanopartículas de cobre y de plata presentes en los recubrimientos. En las figuras 5.9.A, B y C se recogen las micrografías electrónicas de transmisión para los recubrimientos con vidrio-nAg a 740°C, vidrio-nCu a 850°C y vidrio-Cu_{incorporado} a 850°C, respectivamente, sobre sustrato de vidrio en los tres casos. La superficie de los recubrimientos fue sometida a un proceso de desbastado para obtener las muestras en polvo y

prepararlas, según se describe en el apartado 2.16.3 del capítulo 2.

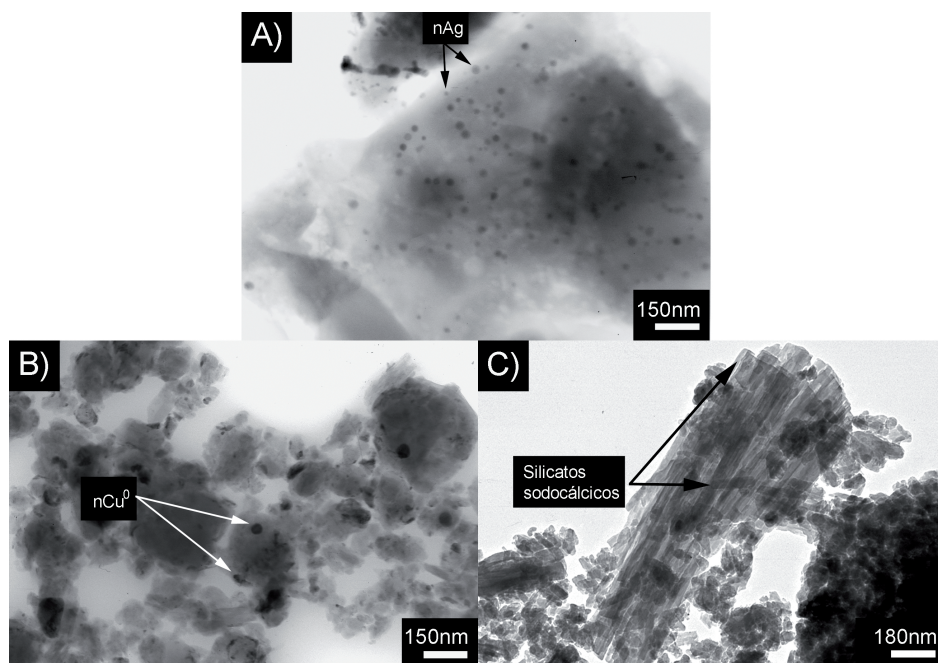


Figura 5.9: Micrografías electrónicas de transmisión para los recubrimientos con: vidrio-nAg a 740°C (A), vidrio-nCu a 850°C (B) y vidrio-Cu_{incorporado} a 850°C (C).

La distribución de tamaño de partícula para el recubrimiento con vidrio-nAg varía de 5 a 50nm y el d_{50} es de 18 ± 5 nm, sin tener en cuenta los aglomerados observados mediante microscopía electrónica de barrido. En el recubrimiento de vidrio-nCu, la distribución de tamaño de nanopartícula varía desde 5 hasta 75nm y el d_{50} es de 15 ± 2 nm. Resultados similares fueron obtenidos para los recubrimientos elaborados a 1150°C, indicando que en ninguno de los casos se ha producido aglomeración significativa de las nanopartículas (ya que los aglomerados

observados por MEB eran pocos y dispersos), manteniéndose de este modo la distribución y el tamaño medio de partícula, similares a la de los polvos de partida. En el caso del vidrio-Cu_{incorporado} se aprecian los cristales de silicatos sodocálcicos observados previamente por microscopía electrónica de barrido. Para el resto de sustratos estudiados (Ce-TZP/nAl₂O₃ y α -alúmina) se obtuvieron resultados similares a los mostrados sobre el sustrato de vidrio para cada tipo de recubrimiento (vidrio-nAg, vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado}).

5.2.3.4. Caracterización mecánica de los recubrimientos

La estabilidad mecánica de los recubrimientos fue evaluada mediante ensayos de indentación para medir la dureza Vickers y la tenacidad. La dureza Vickers se determinó según la ecuación detallada en el capítulo 2 y realizando 4 indentaciones. Debido al escaso espesor de los recubrimientos, las indentaciones se realizaron sobre pastillas de ~ 1 cm de \varnothing y 3 mm de espesor. Los valores medios de dureza Vickers para los recubrimientos de vidrio sodocálcico, vidrio-nAg (2,6 %Ag), vidrio-nAg (10 %Ag), vidrio-nAg (20,5 %Ag), vidrio-nCu (20 %Cu) y vidrio-Cu_{incorporado} (20 %Cu) obtenidos fueron (GPa): $3,63 \pm 0,05$; $3,34 \pm 0,05$; $3,32 \pm 0,04$; $3,31 \pm 0,05$; $2,98 \pm 0,1$; $2,61 \pm 0,1$. La tenacidad de cada recubrimiento fue calculada según la ecuación mostrada en el capítulo 2, obteniéndose los siguientes valores medios de K_{IC} (MPa \cdot m^{1/2}): $0,73 \pm 0,03$; $0,82 \pm 0,03$; $0,86 \pm 0,04$; $1,37 \pm 0,04$; $0,87 \pm 0,08$ y $0,77 \pm 0,08$ para los recubrimientos de vidrio sodocálcico, vidrio-nAg (2,6 %Ag), vidrio-nAg (20,5 %Ag), vidrio-nCu (20 %Cu) y vidrio-Cu_{incorporado} (20 %Cu), respectivamente.

En la figura 5.10 se exponen los datos experimentales de dureza y tenacidad para los vidrios con nanopartículas de plata. De estos resultados se infiere que la adición de plata o cobre al vidrio aumenta su tenacidad mientras que disminuye su dureza. Este hecho es más acusado en el caso de la plata.

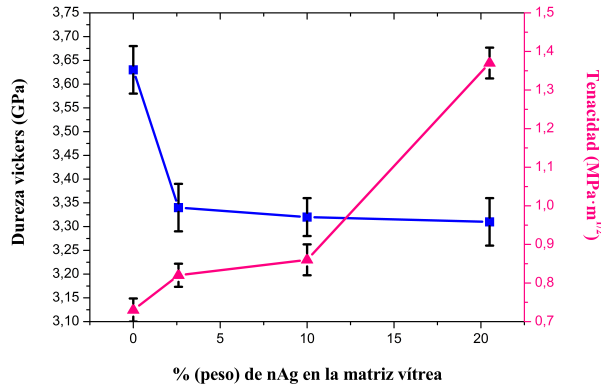


Figura 5.10: Valores de dureza Vickers (izda.) y de tenacidad (dcha.) en función de la cantidad de nanopartículas de plata en el vidrio-nAg.

5.3. Actividad biocida de los recubrimientos sobre materiales cerámicos oxídicos

La actividad biocida fue evaluada frente a la bacteria gram-negativa *Escherichia coli* JM110, la bacteria gram-positiva *Micrococcus luteus* y la levadura *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y siguiendo el procedimiento descrito por F. Malpartida, basado en las indicaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, actualmente *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) que fue modificado para poder realizar el conteo de viables. Este nuevo procedimiento está detallado en el capítulo de materiales y métodos. La reducción logarítmica en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cultivo se calculó según la ecuación 5.1:

$$\text{Reducción logarítmica} = \log A - \log B \quad (5.1)$$

donde A es el número de UFC/mL en el cultivo control después de 48h y

B es el número de UFC/mL en el cultivo que contiene al agente biocida transcurridas 48h. Los resultados de la reducción logarítmica en el número de viables para cada recubrimiento se muestran en la tabla 5.4. Como puede deducirse, los únicos recubrimientos con actividad biocida son los realizados con vidrio-nAg a 740°C y los realizados con vidrio-nCu a 850°C, independientemente del sustrato utilizado (Ce-TZP/nAl₂O₃, α -alúmina o vidrio).

Recubrimiento	Reducción logarítmica de UFC		
	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>I. orientalis</i>
Vidrio-nAg (740°C)	5,80±0,06	5,90±0,06	5,11±0,07
Vidrio-nCu (850°C)	3,00±0,04	2,15±0,04	3,10±0,04
Vidrio-nCu (1150°C)	0,00±0,02	0,00±0,04	0,00±0,02
Vidrio-Cu_{incorporado} (850°C)	0,47±0,03	0,85±0,02	0,00±0,03
Vidrio-Cu_{incorporado} (1150°C)	0,00±0,02	0,00±0,05	0,00±0,02

Tabla 5.4: Reducción logarítmica de las UFC de *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* para los recubrimientos de: vidrio-nAg a 740°C, vidrio-nCu a 850°C, vidrio-nCu a 1150°C, vidrio-Cu_{incorporado} a 850°C y vidrio-Cu_{incorporado} a 1150°C.

En la figura 5.11 se muestran ejemplos de los antibiogramas realizados durante este trabajo de tesis, junto con una imagen insertada en la parte superior derecha de los recubrimientos obtenidos. En las figuras 5.11A, B y C pueden verse los halos de inhibición correspondientes a un recubrimiento con vidrio-nAg sobre α -alúmina, vidrio y Ce-TZP/nAl₂O₃ para cultivos con *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis*, respectivamente. En la figura 5.11C se ha incluido también el sustrato de Ce-TZP/nAl₂O₃ sin recubrir (dcha.) que se utiliza como control y, en consecuencia, no presenta halo de inhibición. En la figura 5.11D no se detecta halo de inhibición, lo cual está de acuerdo con los resultados resumidos en la tabla 5.4, donde los recubrimientos con vidrio-Cu_{incorporado} no muestran

actividad biocida. Por el contrario, los recubrimientos realizados con vidrio-nCu tanto sobre vidrio como sobre α -alúmina (figuras 5.11E y F) sí presentan halo de inhibición, indicando que poseen actividad biocida frente a *M. luteus* e *I. orientalis*, respectivamente.

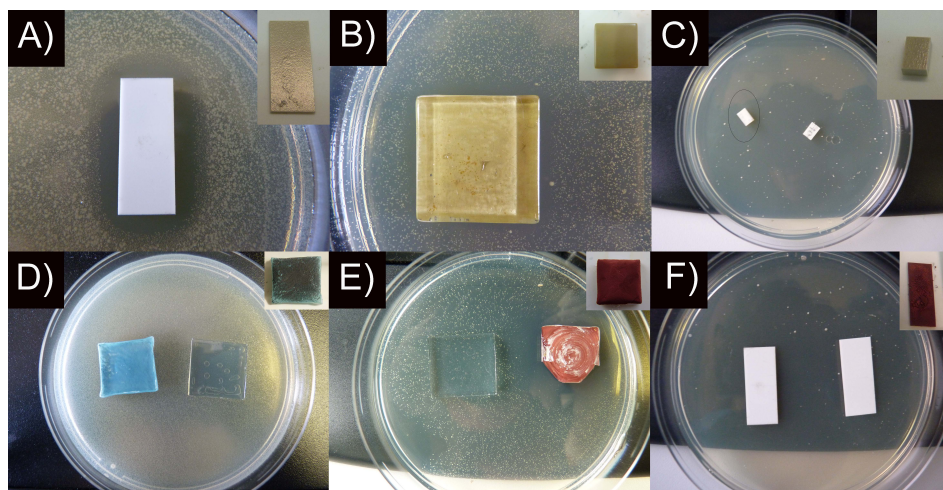


Figura 5.11: Antibiogramas obtenidos para recubrimientos de vidrio-nAg sobre: α -alúmina frente a *E. coli* (A), vidrio frente a *M. luteus* (B) y Ce-TZP/ $n\text{Al}_2\text{O}_3$ frente a *I. orientalis*; recubrimiento de vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$ sobre vidrio frente a *E. coli* (D) y recubrimientos de vidrio-nCu sobre vidrio frente a *M. luteus* (E) y sobre α -alúmina frente a *I. orientalis* (F).

La liberación de plata o cobre al medio por parte de los recubrimientos es muy importante desde el punto de vista de su durabilidad y su toxicidad. Por ello se analizó la cantidad total de plata o de cobre liberada por unidad de área de recubrimiento, siguiendo un nuevo método explicado en el apartado 2.21.2 del capítulo de materiales y métodos. En la figura 5.12 se representa la reducción logarítmica de las unidades formadoras de colonias, frente a la cantidad de plata o cobre lixiviada por unidad de área de recubrimiento. Los recubrimientos realizados con vidrio- $\text{Cu}_{\text{incorporado}}$

no han sido incluidos, debido a que no lixivian cobre y tampoco presentan actividad biocida. A su vez, se ha incluido un recubrimiento de vidrio-nAg sobre alúmina, sinterizado a 850°C con el fin de obtener más datos y poder correlacionar la cantidad de nanopartículas lixiviadas y su acción biocida.

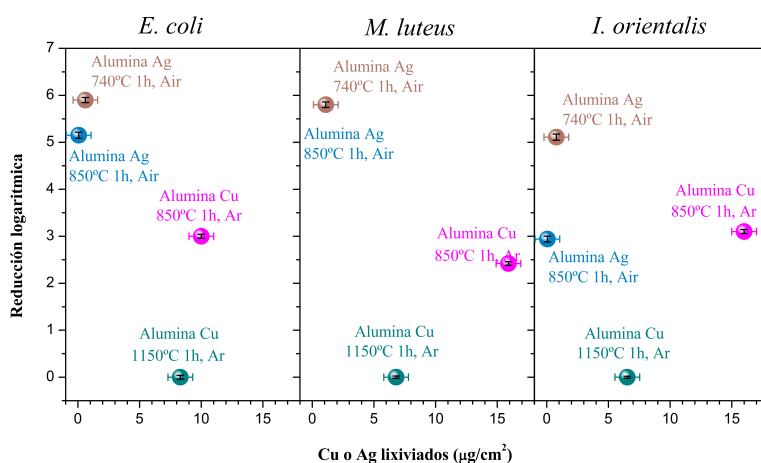


Figura 5.12: Reducción logarítmica de UFC para *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* frente a la cantidad total de plata o cobre lixiviada por unidad de área de recubrimiento para: vidrio-nAg sobre sustrato de α -alúmina a 740°C, vidrio-nAg sobre α -alúmina a 850°C, vidrio-nCu sobre α -alúmina a 850°C y vidrio-nCu sobre α -alúmina a 1150°C.

Los resultados obtenidos muestran que las nanopartículas de plata en las condiciones experimentales empleadas y con los microorganismos estudiados son significativamente más efectivas que las de cobre, puesto que con menos cantidad lixiviada consiguen mayores reducciones del número de viables. Esto es importante teniendo en cuenta la controversia que existe actualmente sobre la actividad biocida de las nanopartículas de plata y de cobre.^{8,9} En el caso de *E. coli* la lixiviación de 1 µg/cm² de

plata produce una elevada actividad biocida reduciendo en 6 logaritmos el número de células. Por el contrario, fue necesaria la lixiviación de $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cobre para alcanzar una reducción logarítmica de 3. Resultados similares fueron obtenidos para la bacteria gram-positiva *M. luteus* y para la levadura *I. orientalis*. En conclusión, los recubrimientos con vidrio-nAg fueron los únicos recubrimientos densos que mostraron actividad biocida, puesto que los recubrimientos con vidrio-nCu densos (sinterizados a 1150°C) lixiviaron $\sim 7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cobre, lo cual no fue suficiente para alcanzar una actividad biocida aceptable. En este caso, es necesario tener porosidad abierta $\sim 40\%$ para favorecer la lixiviación de las nanopartículas de cobre, y de este modo, conseguir una buena actividad biocida. En cambio, los recubrimientos con vidrio-Cu_{incorporado} no fueron activos debido a que el Cu^{2+} está formando parte de la red vítrea como catión modificador, de modo que se lixivia en menor cantidad.

5.4. Bibliografía

1. A. D. Pye, et al. A review of dental implants and infection. J. Hosp. Infect. 2009;72(2):104-110.
2. A. S. Hoffman, H. L. L., S. Best. Biomaterials Science. San Diego (USA): Elsevier, 2004.
3. G. Turner, D. Lacroix, J. A. Planell. Biomedical Materials. New York (USA): Springer, 2009.
4. J. E. Kogel, et al. Industrial minerals & rocks: commodities, markets, and uses. Littleton (U.S.): Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, 2006.
5. R. S. Byrne, P. B. Deasy. Use of commercial porous ceramic particles for sustained drug delivery. Int. J. Pharm. 2002;246(1-2):61-73.
6. P. Boch, J. C. Nièpce. Ceramic materials: processes, properties and applications. London: ISTE ltd, 2007.
7. R. Sondhi, R. Bhave, G. Jung. Applications and benefits of ceramic membranes. Membr. Technol. 2003;2003(11):5-8.
8. J. P. Ruparelia, et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 2008;4(3):707-716.
9. K. Y. Yoon, et al. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. Sci. Total Environ. 2007;373(2-3):572-575.

Capítulo 6

Recubrimientos biocidas sobre la aleación Ti-6Al-4V

Estos recubrimientos han sido diseñados sobre sustrato de titanio y sus aleaciones para ser utilizados en el futuro en implantes médicos. Más del 90% de los implantes dentales son de titanio, al igual que la gran mayoría de los implantes médicos que soportan cargas estructurales, como las prótesis de cadera o la tornillería para fijar fracturas óseas.¹⁻³

En una primera etapa se estudiaron los recubrimientos sobre placas de la aleación de titanio 90Ti-6Al-4V y, una vez optimizados todos los parámetros, se procedió a realizar recubrimientos sobre pilares de cicatrización de implantes dentales de esta misma aleación.

6.1. Obtención de recubrimientos biocidas sobre la aleación Ti-6Al-4V

Los recubrimientos se llevaron a cabo con el polvo de vidrio-nAg (20%Ag) obtenido a partir de vitelinato-nAg sobre placas de la aleación de titanio 90Ti-6Al-4V de dimensiones 12,5 x 8,3 x 1mm y con un 99,0% de pureza,

suministradas por Goodfellow ref.017940/8. El procedimiento de obtención de estos recubrimientos es similar al descrito en el capítulo 5. La temperatura de sinterización debe elegirse en función de la microscopía de calefacción, pero dicha microscopía fue realizada sobre soporte de alúmina y en este caso el sustrato es una aleación de titanio, por lo que la mojabilidad del recubrimiento es diferente y, además, la plata se alea con el titanio, influyendo también en el ángulo de contacto. Por ello se realizó una serie de experimentos encaminados a determinar la variación del ángulo de contacto con la temperatura usando el método de la gota sésil (*sessile drop*). Este método consiste en depositar pseudoesferas de vidrio-nAg (20%Ag) sobre las placas de la aleación de titanio y sinterizarlas en atmósfera de argón (para evitar la oxidación del titanio) durante 1h a diferentes temperaturas, con el fin de determinar el ángulo de contacto y la adherencia del vidrio-nAg al sustrato de titanio. Teniendo en cuenta la posible degradación térmica del titanio a alta temperatura ($>1000^{\circ}\text{C}$) debido a la transformación de fase² de $\alpha \rightarrow \beta$, la temperatura óptima encontrada fue 980°C . En la figura 6.1 se ilustra el método de la gota sésil donde se muestra una gota de líquido que moja parcialmente una superficie sólida, siendo γ_{lv} , γ_{sv} y γ_{sl} las tensiones superficiales líquido-vapor, sólido-vapor y sólido-líquido, respectivamente, y θ_c el ángulo de contacto.

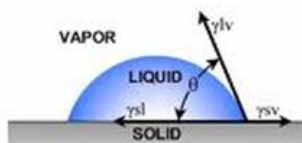


Figura 6.1: Esquema del método de gota sésil.

Se considera que un líquido moja una superficie cuando $\theta_c < 90^{\circ}$, que es el caso de figura 6.1. En el caso de $\theta_c > 90^{\circ}$ se dice que el líquido no moja o que posee poca mojabilidad. Estas dos situaciones se ilustran en la figura

6.2, donde el caso A corresponde a un material con poca mojabilidad y el caso B a un material con elevada mojabilidad.

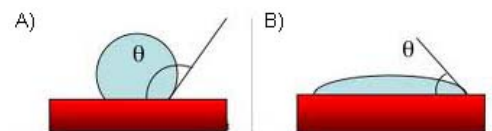


Figura 6.2: Representación esquemática de una gota con poca mojabilidad (A) y una gota con buena mojabilidad (B).

En la figura 6.3 se muestran las imágenes de las pseudoesferas sinterizadas a 980°C sobre placas de la aleación de titanio para diferentes concentraciones de plata en el vidrio (0; 2,6; 10; 17 y 20%Ag). En el margen de composiciones estudiadas, el ángulo de contacto obtenido disminuye con el incremento de plata en el vidrio, de manera que se va mejorando la mojabilidad. En el rango de concentraciones de plata de 0 a 10%, el ángulo de contacto es obtuso ($>90^{\circ}$), es decir, no hay mojabilidad hasta alcanzar un contenido en plata del 17%, donde el vidrio-nAg comienza a mojar ($\theta_c < 90^{\circ}$), según se muestra en la figura 6.3. Esto se estudiará en mayor profundidad a lo largo de este capítulo, igual que las posibles degradaciones térmicas del sustrato y del recubrimiento.

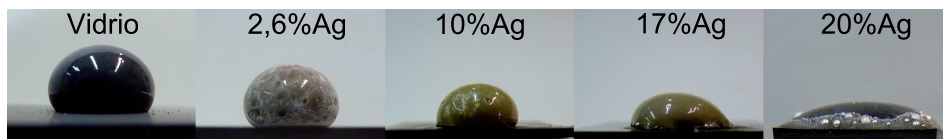


Figura 6.3: Método de la gota sésil para pseudoesferas de vidrio con diferentes contenidos (%peso) de Ag.

6.2. Caracterización de los recubrimientos sobre placas de la aleación Ti-6Al-4V

El recubrimiento fue caracterizado mediante análisis químico, difracción de Rayos X, espectroscopía UV-vis, análisis de la estabilidad mecánica, estudio de mojabilidad y adherencia del vidrio-nAg al sustrato de la aleación de titanio, microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

6.2.1. Análisis químico

Los polvos de partida de vidrio-nAg utilizados para el recubrimiento fueron los mismos que se emplearon en los recubrimientos sobre sustratos cerámicos y sobre vidrio, cuyo análisis químico aparece en el apartado 5.2.1.

6.2.2. Difracción de Rayos X, espectroscopía UV-visible y estabilidad mecánica

El difractograma de Rayos X y la espectrometría de absorción fueron similares a los mostrados en el apartado de recubrimientos sobre óxidos cerámicos (figura 5.2A), indicando que la plata no se ha oxidado a 980°C, ya que aparecen los picos de difracción de Bragg correspondientes a la plata metálica y el máximo de absorción asociado al plasmón de superficie de la plata nanométrica.

También se realizaron difracciones de Rayos X para las placas de titanio tratadas a diferentes temperaturas (980°C, 1190°C y 1215°C durante 1h), con objeto de determinar la fracción de fase β del titanio, así como la fragilización que ello puede ocasionar en el sustrato metálico.

Considerando que el coeficiente de absorción másica (μ) es el mismo para todas las muestras y que los ángulos de los picos seleccionados están muy próximos (2θ varía de 37° a 40°) la cantidad de fase β puede ser determinada mediante la ecuación de Evans et al.⁴ (ec. 6.1):

$$X_\beta = \frac{I_{\beta(110)}}{I_{\beta(110)} + I_{\alpha(002)} + I_{\alpha(101)}} \quad (6.1)$$

siendo $I_{\alpha(002)}$, $I_{\alpha(101)}$ e $I_{\beta(110)}$ las áreas de los picos correspondientes. La fracción de fase β frente a la temperatura de cada tratamiento térmico aparece representada en la figura 6.4. Se han incluido también dos micrografías de las marcas de indentación tras el tratamiento térmico. Según se muestra en la figura 6.4, a 980°C no hay incremento apreciable en la fase β mientras que a mayor temperatura el contenido en esta fase se va incrementando notablemente, hasta llegar a 1215°C donde se alcanza un nivel de transformación de $\alpha \rightarrow \beta$ mayor del 90% y la aleación se fragiliza y se agrieta.

También se analizó la estabilidad mecánica de los recubrimientos sinterizados a diferentes temperaturas realizando indentaciones para poder determinar con ello la dureza Vickers. Los resultados de la dureza Vickers para las placas de la aleación de titanio tratadas a 980°C , 1190°C y 1215°C fueron (Kg/mm^2): 328 ± 8 , 350 ± 9 y 680 ± 15 , respectivamente. La placa de titanio sin tratar térmicamente presentó una dureza Vickers de 350 ± 7 . Estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante difracción de Rayos X, ya que al incrementar la temperatura aumenta el contenido en fase β , produciéndose un endurecimiento progresivo hasta llegar al agrietamiento de la aleación de titanio tratada a 1215°C .

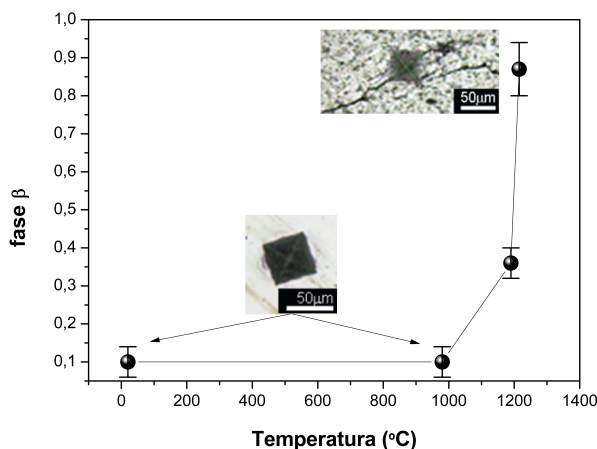


Figura 6.4: Contenido de fase β en la aleación de titanio a temperatura ambiente y tratada a 980°C, 1190°C y 1215°C. Han sido insertadas las marcas de indentación sobre las placas de titanio.

6.2.3. Estudio de mojabilidad y adherencia al sustrato

El método de la gota sésil fue empleado para medir el ángulo de contacto en función de la concentración de plata y de la composición de la fase vítrea, con el fin de evaluar si el recubrimiento de vidrio-nAg sobre el titanio es el idóneo. Para ello, se fabricaron pseudoesferas de vidrio-nAg (10mm de \varnothing) con las siguientes concentraciones de plata (%peso): 2,6; 10 y 20%, realizadas mediante prensado isostático a 150MPa, que fueron depositadas sobre las placas de la aleación de titanio y sinterizadas a 980°C en atmósfera de argón durante 1h. En la figura 6.5 se muestra la sección transversal (obtenida por microscopía electrónica de barrido) de la gota sésil que contiene un 2,6% de plata, donde se observa que la mayoría de las nanopartículas de plata están localizadas a lo largo de la interfase líquido-vapor, produciendo la aparición de algunos aglomerados.

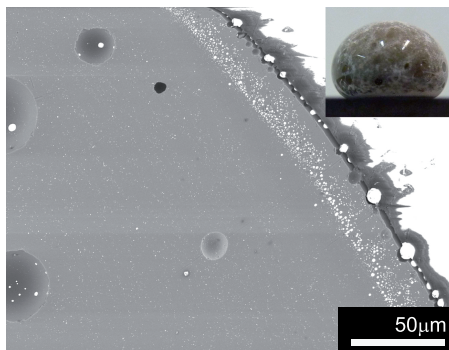


Figura 6.5: Micrografía electrónica de barrido de la sección transversal vidrio-nAg/aleación de titanio para una gota sésil con un contenido de nAg del 2,6%, obtenida tras el tratamiento a 980°C en atmósfera de argón. La fotografía de la gota sésil aparece insertada.

La variación del ángulo de contacto frente a la concentración de plata en la matriz vítrea de la gota sésil a 980°C aparece representada en la figura 6.6A. Asimismo, la variación del ángulo de contacto con el contenido en óxido de sodio de la matriz vítrea (sin nanopartículas de plata) a 980°C se muestra en la figura 6.6B.

El contenido de óxido de sodio en la matriz vítrea depende de la cantidad de nanopartículas de plata requerida, ya que el vidrio-nAg se ha obtenido a partir de vitelinato-nAg, el cual aporta óxido de sodio a la fase vítrea (tabla 6.1). De esta manera, cuanto mayor es el contenido en plata del vidrio mayor es la cantidad de óxido de sodio incorporada con el vitelinato-nAg. Para hacer este estudio se prepararon vidrios con un contenido de Na_2O similar al de la matriz vítrea de los diferentes vidrios-nAg analizados. Estos vidrios se obtuvieron por fusión en crisol de platino a 1500°C.

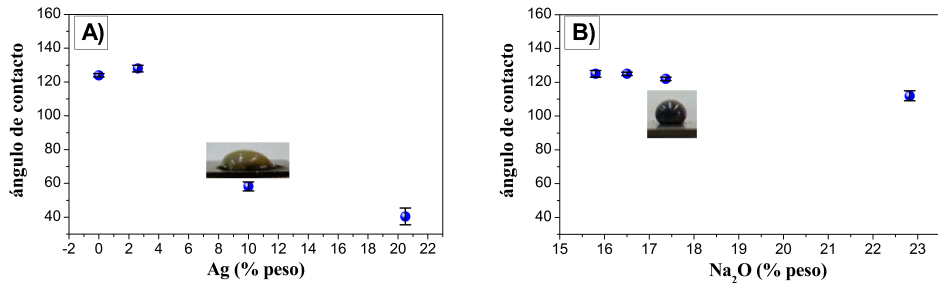


Figura 6.6: Ángulos de contacto frente al contenido en: plata (A) y óxido de sodio (B) en la matriz vítrea de las gotas sésiles sinterizadas sobre el sustrato de la aleación de titanio a 980°C, 1h en atmósfera de argón. Se han insertado dos imágenes de las gotas sésiles correspondientes a las siguientes composiciones (%peso): 10%nAg (A) y 17,37%Na₂O(B).

Muestra	Ag (%peso)	Na ₂ O(%peso)
Vidrio 0 %	0	15,8
Vidrio-nAg (2,6 %)	2,6	17,08
Vidrio-nAg (10%)	10	17,37
Vidrio-nAg (20%)	20	24,5

Tabla 6.1: Composición (%peso) de Na₂O de los vidrios estudiados.

Como puede deducirse de la figura 6.6B, el incremento en el contenido de óxido de sodio en la matriz vítrea no afecta de manera apreciable a la mojabilidad,⁵ Sin embargo, las nanopartículas de plata causan un fuerte efecto, disminuyendo el ángulo de contacto a la mitad (60°) para el caso del vidrio-nAg que contiene un 10% de nanopartículas de plata, según se aprecia en la figura 6.6A. Para contenidos inferiores al 10% de plata, los ángulos de contacto obtenidos son obtusos, lo que significa que $\gamma_{sv} < \gamma_{sl}$. Sin embargo, para mayores contenidos de plata (>8% peso), el valor de γ_{sv} debe incrementarse hasta alcanzar la situación de $\gamma_{sv} > \gamma_{sl}$ justificando

la disminución del ángulo de contacto hasta obtener ángulos agudos ($<90^\circ$).

Los recubrimientos fueron realizados a 980°C , temperatura a la cual la aleación de titanio no sufre degradación, según se ha determinado en el apartado anterior. A esta temperatura las nanopartículas de plata se encuentran fundidas y coalescen dando lugar a esferas de tamaño micrométrico. El ángulo de contacto de las partículas fundidas de plata con la aleación de titanio es relativamente alto ($>90^\circ$),⁶ de manera que el fundido en el interior de los poros es inestable durante la densificación de los recubrimientos y es exudado hacia las interfases sólido/líquido y líquido/vapor⁷, disminuyendo las correspondientes energías interfaciales (γ_{sl} y γ_{lv}). Este hecho provoca la reducción en el ángulo de contacto, según predice la ecuación de Young (6.2):

$$\frac{(\gamma_{sv} - \gamma_{sl})}{\gamma_{lv}} = \cos \theta \quad (6.2)$$

La plata fundida exudada hacia la interfase vidrio/titanio se alea con el titanio. A su vez, el vidrio también reacciona con el titanio formando siliciuros. Según los diagramas de fases Ti-Ag⁸ y Ti-Si-Ag⁹ mostrados en las figuras 6.7 y 6.8, respectivamente, a 980°C , el $\beta\text{-Ti}_{(ss)}$, Ti_3Si y TiAg son compuestos compatibles en estado sólidos que pueden formarse en la interfase.

También se realizó un análisis de dispersión de energía de Rayos X (EDS) que confirmó la presencia de Si y Ag en la interfase (figura 6.9A). En esta figura se representa el análisis de EDS a lo largo de la sección transversal de la interfase vidrio-nAg/Ti donde se muestra que la Ag se alea con el Ti, ya que no se pudo determinar Ag justo en la zona próxima a la interfase. Finalmente, y como consecuencia de este hecho, las capas interfaciales proporcionan una excelente adhesión⁵ como se desprende de la micrografía electrónica de transmisión de la figura 6.9B.

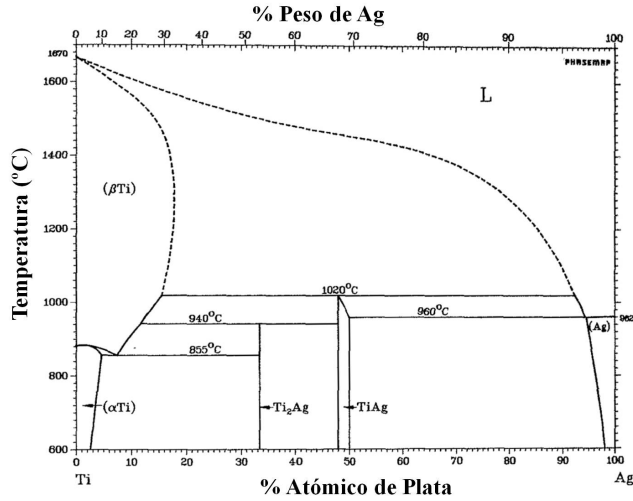


Figura 6.7: Diagrama binario del sistema Ti-Ag.⁸

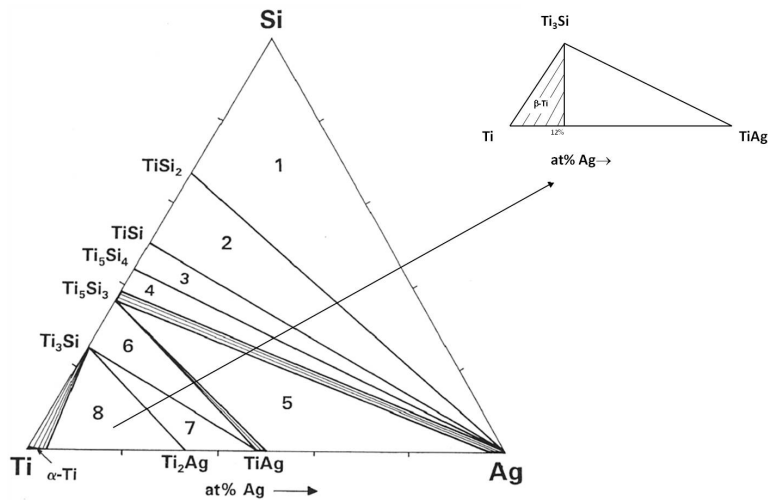


Figura 6.8: Isoterma del diagrama ternario Ti-Si-Ag a 850°C.⁹ Detalle de la isoterma de Si-Ti-Ag a 980°C.

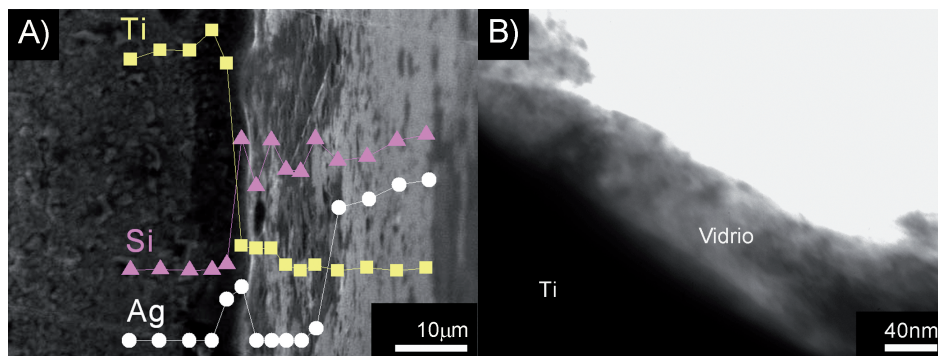


Figura 6.9: Micrografía electrónica de barrido de la sección transversal de una placa de titanio recubierta con vidrio-nAg (2,6 % Ag) y análisis elemental por EDS a lo largo de la interfase vidrio-nAg/Ti (A). Micrografía electrónica de transmisión de la sección transversal de una placa de la aleación de titanio recubierta con vidrio-nAg (20 % Ag) mostrando la interfase vidrio-nAg/Ti (B).

6.2.4. Caracterización microestructural

La caracterización microestructural de los recubrimientos de vidrio-nAg sobre la aleación de titanio se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

6.2.4.1. Microscopía electrónica de barrido

Las figuras 6.10A, B y C muestran la superficie de los recubrimientos sobre placas de la aleación de titanio de vidrio-nAg con un contenido en plata de 2,6, 10 y 20 % (%peso), respectivamente. Las micrografías muestran una dispersión homogénea de la plata y un recubrimiento libre de grietas. Esto se debe a que el coeficiente de expansión térmica de la aleación de titanio para el rango 10-800°C es de $9,7 \cdot 10^{-6} \text{ (}^\circ\text{C}^{-1}\text{)}$ y, por tanto, la diferencia entre los coeficientes del recubrimiento y del sustrato no es muy elevada

$\sim 1,3 \cdot 10^{-6} (^{\circ}\text{C}^{-1})$. La placa recubierta con el vidrio-nAg de mayor contenido en plata (20%) muestra algunos aglomerados de entre 1 y $5\mu\text{m}$.

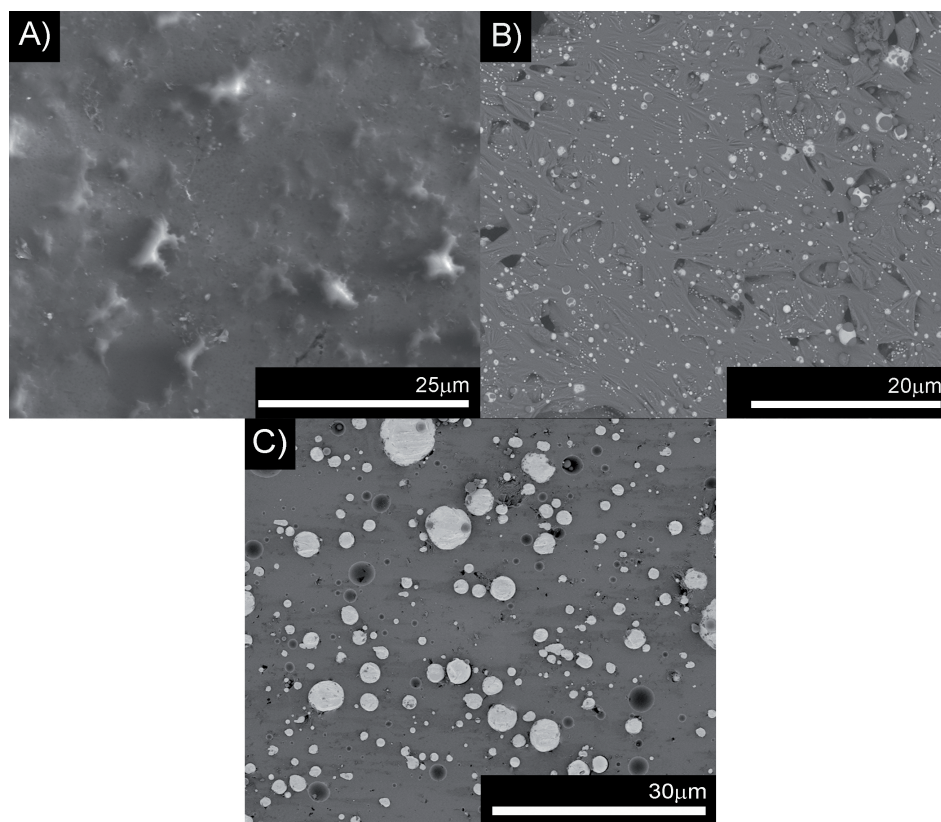


Figura 6.10: Micrografías electrónicas de barrido de las placas de titanio recubiertas con vidrio-nAg con diferentes contenidos de n-Ag (%peso): 2,6% (A), 10% (B) y 20% (C).

La interfase vidrio-nAg/Ti también fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido. El espesor de la capa de los recubrimientos resultó ser de $25\mu\text{m}$. En la figura 6.11 se muestran las micrografías

correspondientes a la interfase vidrio-nAg/Ti para los recubrimientos de vidrio-nAg con diferentes contenidos de plata (2,6 y 20 %).

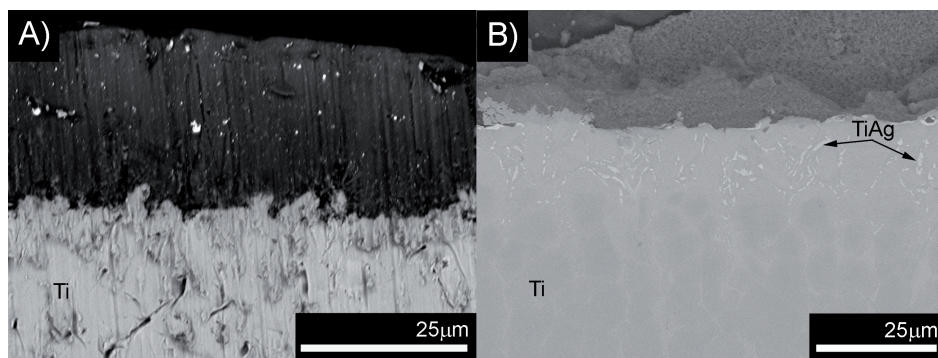


Figura 6.11: Micrográficas electrónicas de barrido de la interfase Vidrio-nAg/Ti para las placas de titanio recubiertas con vidrio-nAg de diferentes contenidos en nanopartículas de plata (%peso): 2,6 % (A) y 20 % (B).

En la figura 6.11B se observan precipitados de TiAg que se han formado justo en la interfase, como se deduce del diagrama de fases de la figura 6.7. En el caso del recubrimiento con vidrio-nAg (2,6 %) estos precipitados no se observan, ya que al tener menor contenido en plata, ésta entra en solución sólida en el titanio sin llegar al nivel requerido para alcanzar el campo de precipitación del TiAg, como también indica el diagrama de fases.

6.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

En las figuras 6.12A y B se recogen las micrográficas electrónicas de transmisión para los recubrimientos de vidrio-nAg con un contenido en plata de 2,6 y 20 %, respectivamente, donde se observa una distribución homogénea de las nanopartículas de plata. La distribución de tamaño de partícula para ambos recubrimientos varía desde 5 hasta 50nm y el d_{50} es de 17 ± 4 nm.

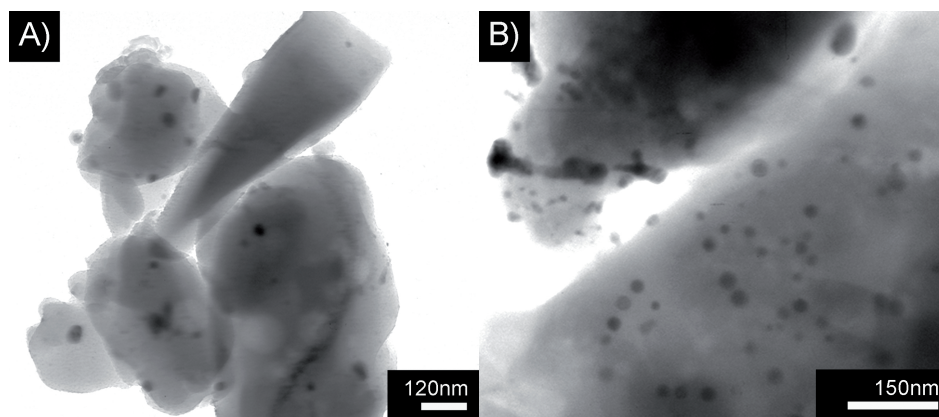


Figura 6.12: Micrografías electrónicas de transmisión de los polvos de vidrio-nAg empleados para realizar los recubrimientos con diferentes concentraciones de plata (%peso): 2,6 % (A) y 20 % (B).

6.3. Actividad biocida de los recubrimientos sobre placas de Ti-6Al-4V

El estudio de la actividad biocida de las placas de Ti-6Al-4V recubiertas con vidrio-nAg (20% Ag) se realizó siguiendo diferentes métodos con el objeto de tener una visión más completa de la acción antimicrobiana del material.

6.3.1. Antibiógramas

Para estudiar la actividad biocida de las placas de 90Ti-6Al-4V recubiertas con vidrio-nAg (20% Ag) se emplearon las bacterias gram-negativa *Escherichia coli* JM110, la gram-positiva *Micrococcus luteus* y la levadura *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, según el procedimiento descrito por F. Malpartida, detallado en el capítulo de materiales y métodos. Los

resultados de la reducción logarítmica en el número de viables para *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* fueron: $5,10 \pm 0,02$; $6,30 \pm 0,01$ y $3,23 \pm 0,02$; respectivamente, lo que significa una desinfección segura y una elevada actividad biocida tras 24h. En la figura 6.13, se recoge, a modo de ejemplo, el antibiograma realizado para *E. coli* mostrando el halo de inhibición obtenido para la placa recubierta con vidrio-nAg (20% Ag), mientras que la placa de titanio sin recubrir no presenta dicho halo de inhibición.

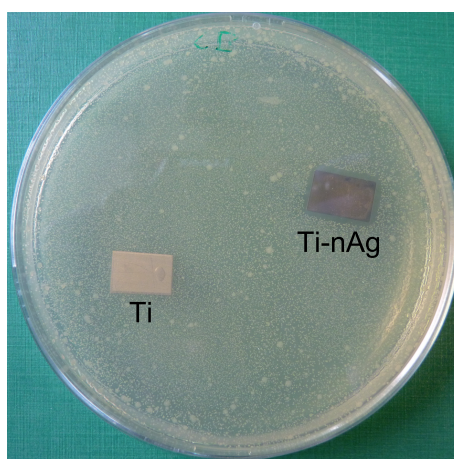


Figura 6.13: Antibiograma sobre *E. coli* para una placa de titanio sin recubrir y una placa de titanio recubierta con vidrio-nAg (20% Ag).

6.3.2. Cultivo en medio líquido

También se realizó un estudio de la actividad biocida tras 24h mediante cultivo en medio líquido (descrito en el capítulo de materiales y métodos) empleando los microorganismos anteriores: *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* para las placas de titanio recubiertas con vidrio-nAg (20% Ag). En este caso, el número de viables fue evaluado mediante densidad óptica,

obteniéndose reducciones logarítmicas >4 para los tres microorganismos estudiados, lo que significa una desinfección segura, según la regulación de agua potable primaria nacional creada por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA).¹⁰ En la figura 6.14 se muestran las imágenes de los ensayos biocidas tras 24h, para: (1) un cultivo control que consta únicamente de microorganismos y nutrientes, (2) un cultivo con una placa de titanio sin recubrir, (3) un cultivo con una placa de titanio recubierta con vidrio y, finalmente, (4) un cultivo con una placa de titanio recubierta con vidrio-nAg (20% Ag).

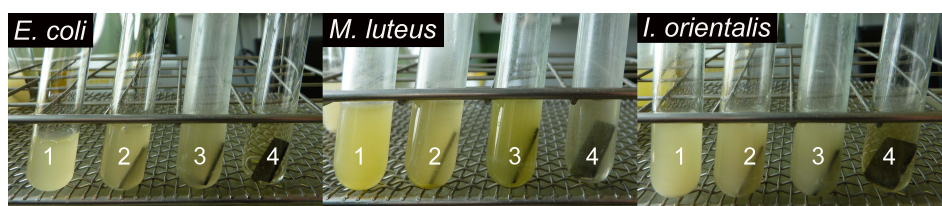


Figura 6.14: Imágenes tras los ensayos biocidas de 24h para: (1) un cultivo control con microorganismos y nutrientes únicamente, (2) un cultivo con una placa de titanio sin recubrir, (3) un cultivo con una placa de titanio recubierta con vidrio y (4) un cultivo con una placa de titanio recubierta por vidrio-nAg (20% Ag).

En esta figura puede observarse cómo los cultivos que contienen las placas recubiertas con vidrio-nAg son los únicos que aparecen transparentes, indicando la ausencia de microorganismos en el medio, ya que el resto aparecen turbios. A su vez se analizó mediante ICP la cantidad de plata liberada por las placas, resultando ser inferior a 10ppm en todos los casos, de manera que no se supera el límite citotóxico para los osteoblastos,¹¹ dato importante para poder usar estos recubrimientos en implantes.

6.3.3. Estudios de *biofilm*

Por último, se estudió la formación de *biofilm* sobre las placas de titanio, tanto recubiertas con vidrio-nAg (20% Ag), como sin recubrir, puesto que

una posible aplicación de estos recubrimientos es en implantes dentales. Por este motivo, para este estudio se emplearon microorganismos propios de la saliva: la cepa estándar de referencia *Streptococcus oralis* ATCC 35037 y dos aislados clínicos (CI-1 y CI-2), pertenecientes a una colección previa de patógenos periodontales (Maestre, REQ2007). La determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó siguiendo dos metodologías diferentes: cristal violeta y conteo de colonias. Los procedimientos completos aparecen descritos en el apartado 2.18.4 del capítulo 2.

En primer lugar se determinó la rugosidad y el área superficial específica tanto de las placas de titanio sin recubrir como de las recubiertas, porque las características físico-químicas de la superficie de los materiales influyen notablemente en los procesos de adhesión¹² y, en concreto, la rugosidad del material juega un papel muy importante.¹³ Se ha observado que las irregularidades en la superficie de los materiales promueven la adhesión y la formación de biofilm mientras que las superficies pulidas las dificultan. Esto parece deberse a que las superficies rugosas tienen una mayor área superficial y, además, las depresiones de los materiales rugosos procuran sitios de colonización más favorables.

En las figuras 6.15 y 6.16 se recogen las topografías superficiales representativas en 3D junto con los perfiles de superficie correspondientes para la placa de titanio sin recubrir y para la placa recubierta con vidrio-nAg (20% Ag), respectivamente. Las imágenes se corresponden con $\sim 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ de área escaneada. Estas imágenes muestran claramente que las placas de titanio sin recubrir presentan una rugosidad (R_a) de $0,08 \pm 0,03 \mu\text{m}$, que está dentro de la escala nanométrica, mientras que la rugosidad de las placas recubiertas es significativamente mayor, siendo de $3,12 \pm 0,43 \mu\text{m}$, perteneciente ya a la escala micrométrica. Esta misma tendencia fue observada para el área superficial específica siendo $1,02 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ para las placas sin recubrir, y $1,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$ para las placas recubiertas.

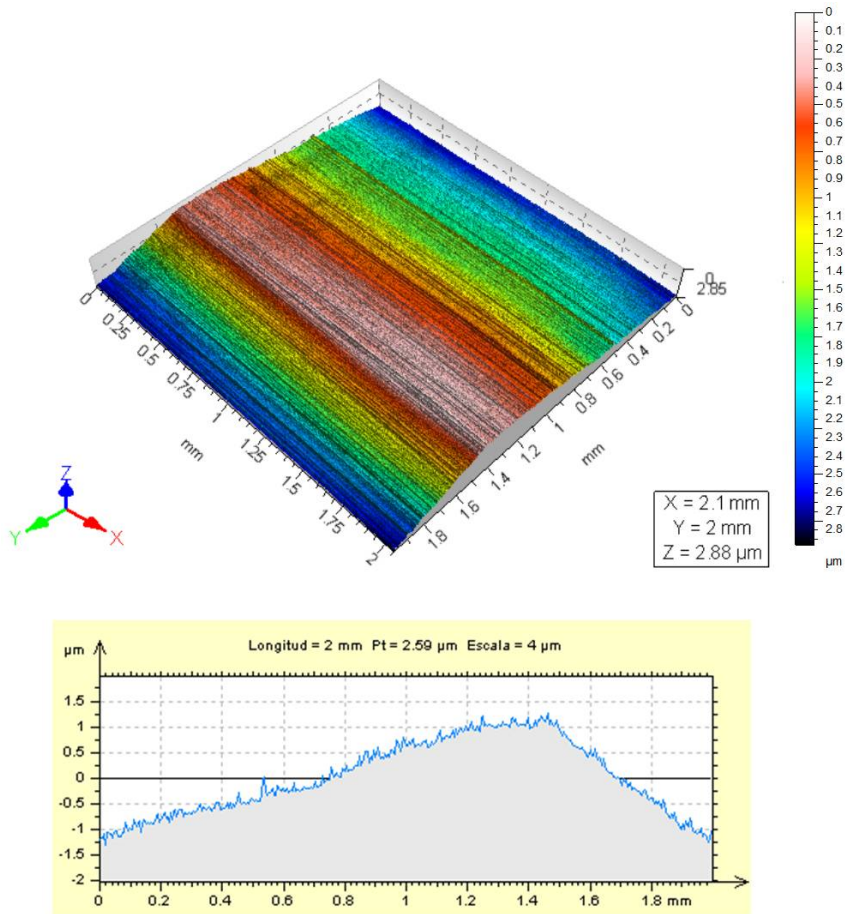


Figura 6.15: Perfilometría de la placa de Ti-6Al-4V sin recubrir, mostrando la topografía superficial en tres dimensiones (arriba), y el perfil superficial con las variaciones de R_a (abajo).

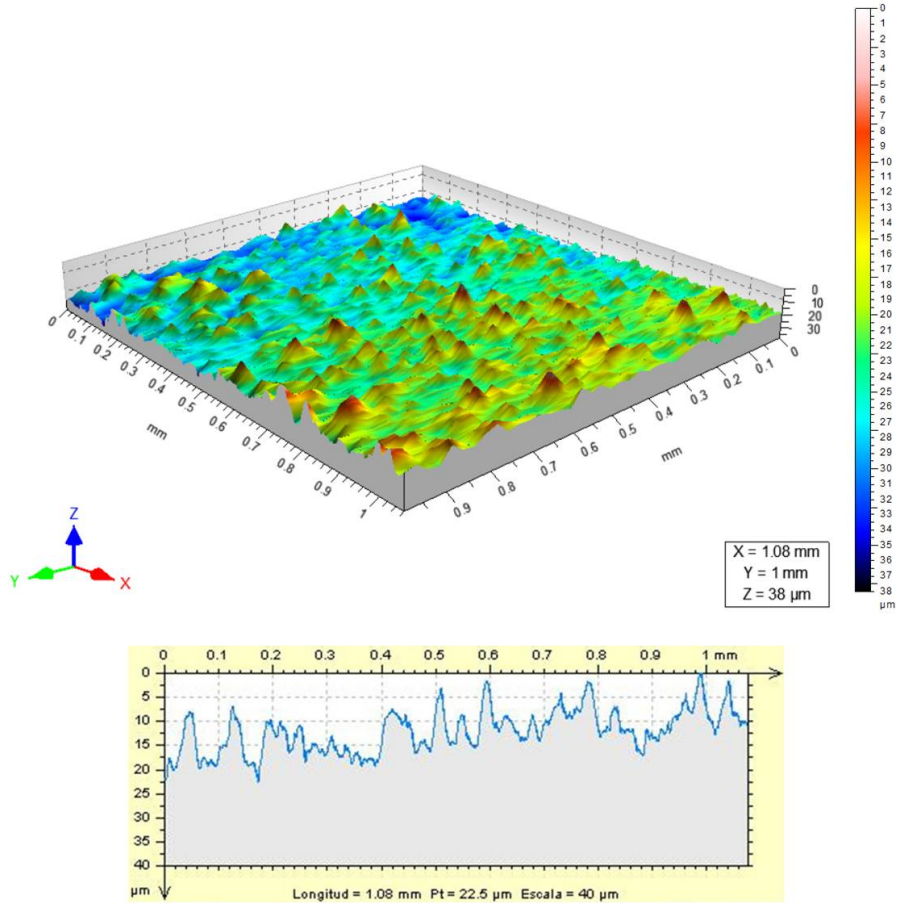


Figura 6.16: Perfilometría de la placa de Ti-6Al-4V recubierta con vidrio-nAg (20% Ag) mostrando la topografía superficial en tres dimensiones (arriba), y el perfil superficial con las variaciones de R_a (abajo).

En la figura 6.17 se muestra el total de la masa de *biofilm* formada para todas las cepas de *S. oralis* determinada mediante cristal violeta. También se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) viables

adheridas tanto a las placas de titanio sin recubrir como a las recubiertas que se representan en la figura 6.18 en forma de \log_{10} de UFC/mm².

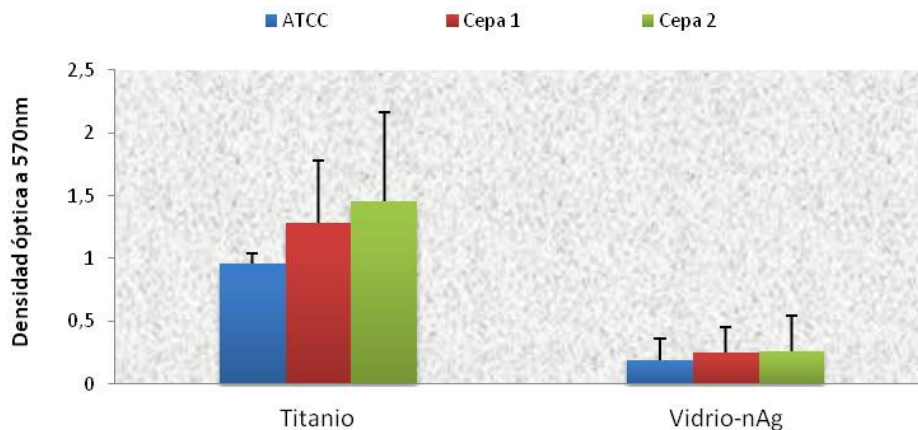


Figura 6.17: Masa total de *biofilm* formada para todas las cepas de *S. oralis* sobre las placas de titanio sin recubrir y sobre las placas de titanio recubiertas con vidrio-nAg (20% Ag).

Los resultados obtenidos muestran que, aun siendo mayor la rugosidad y el área superficial de las placas recubiertas, la formación y crecimiento de *biofilm*, determinados tanto por cristal violeta como por conteo de colonias, fueron sensiblemente menores.

Los resultados obtenidos (figuras 6.17 y 6.18) muestran que los recubrimientos con vidrio-nAg redujeron notablemente la adherencia de *S. oralis* ATCC 35037, Cepa 1 y Cepa 2 respecto a la de las placas de titanio sin recubrir en un 99,8, 99,7 y 99,9%, respectivamente, tras 24h de incubación. En otras palabras, las reducciones logarítmicas de las UFC de ATCC 35037, Cepa 1 y Cepa 2 para las placas recubiertas con vidrio-nAg (calculadas respecto a las placas de titanio sin recubrir) son: $2,80 \pm 0,72$;

$2,59 \pm 0,51$ y $3,34 \pm 0,72$, respectivamente. Esto significa que los recubrimientos con vidrio-nAg inhiben significativamente la formación y crecimiento de *biofilm*.

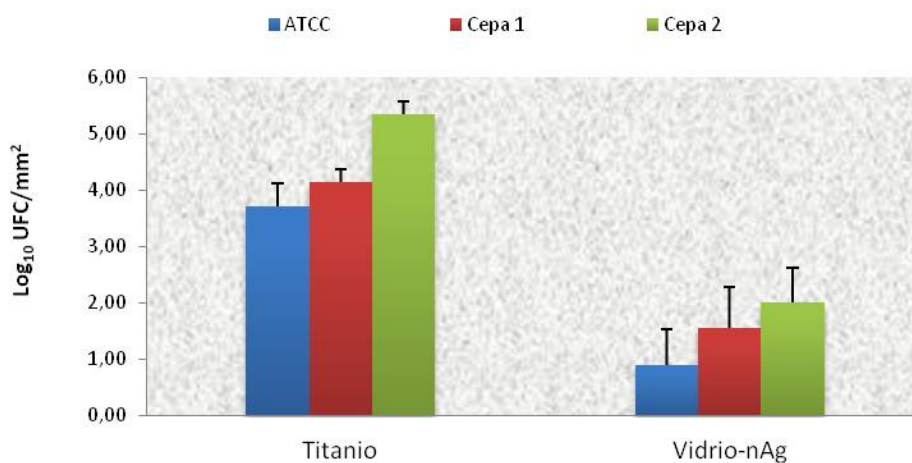


Figura 6.18: Masa total de *biofilm* formada para todas las cepas de *S. oralis* sobre las placas de titanio sin recubrir y sobre las placas de titanio recubiertas con vidrio-nAg (20 % Ag).

También, se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido para determinar el crecimiento de *biofilm* sobre las placas de titanio sin recubrir y sobre las recubiertas con vidrio-nAg. Las imágenes obtenidas tras la formación del *biofilm* de la Cepa 1 a diferentes magnificaciones sobre las placas de titanio sin recubrir y sobre las recubiertas corresponden a las figuras 6.19A y B, respectivamente. De esta figura se desprende que el crecimiento de *biofilm* es mucho mayor sobre las placas de titanio, mientras que sobre las placas recubiertas solo aparecen algunos microorganismos localizados en los poros. Esto constata que el recubrimiento con vidrio-nAg evita la formación y crecimiento de *biofilm*.

y es consistente con los resultados de cuantificación de *biofilm* obtenidos. Resultados similares fueron obtenidos con las cepas ATCC y Cepa 2.

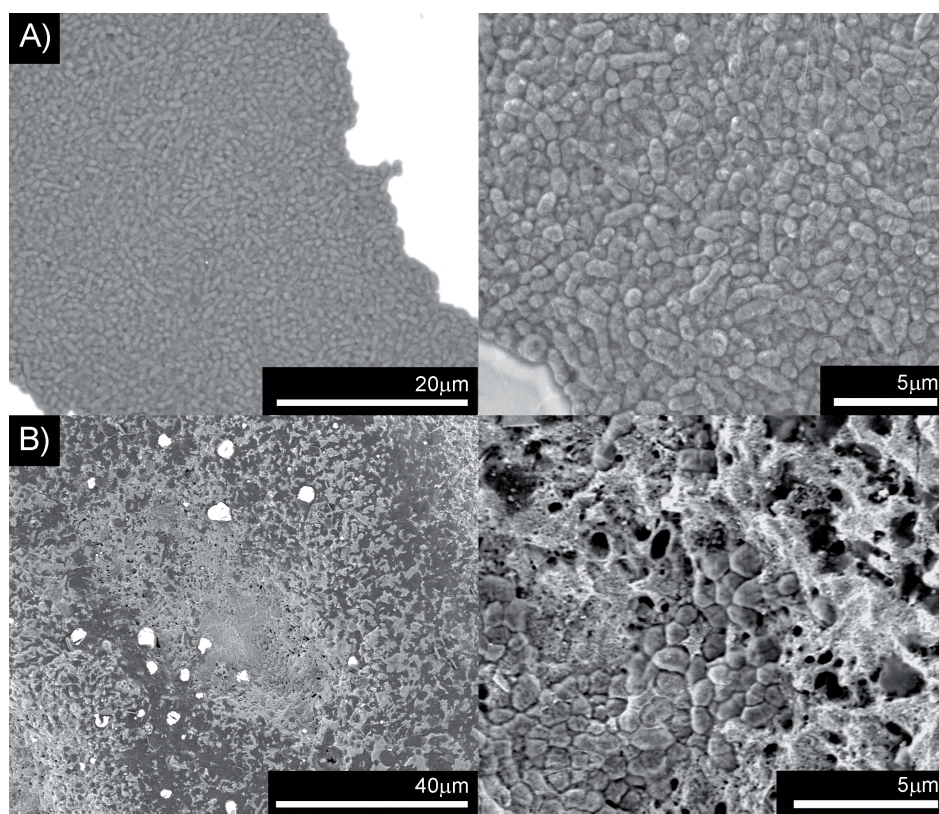


Figura 6.19: Micrográficas electrónicas de transmisión a diferentes magnificaciones tras la formación de *biofilm* de la Cepa 1 para: la placa de titanio sin recubrir (A) y para la placa recubierta (B).

La lixiviación de plata para determinar la toxicidad de los recubrimientos es importante dado que están pensados para ser aplicados en implantes dentales. La cantidad de plata lixiviada por los recubrimientos de

vidrio-nAg fue analizada mediante ICP. Para ello se recogieron los sobrenadantes de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo, hasta 7 días. La cantidad acumulada de plata liberada se muestra en la figura 6.20. La tasa de lixiviación se calculó mediante regresión lineal de los datos experimentales siendo de $0,09\mu\text{g}/\text{h}$, lo cual asegura la duración del recubrimiento por periodos superiores a 30 años así como la no toxicidad de éste.

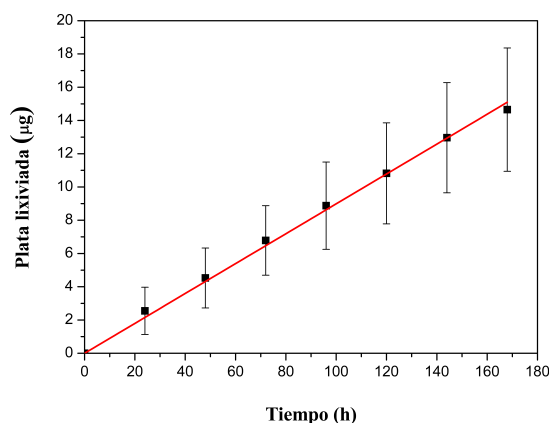


Figura 6.20: Lixiviación acumulada de plata en cultivos a 37°C de los recubrimientos de vidrio-nAg (20% Ag) sobre placas de titanio en función del tiempo.

6.4. Recubrimientos biocidas sobre pilares de cicatrización de la aleación Ti-6Al-4V

Tras la caracterización y el estudio de la actividad biocida de los recubrimientos con vidrio-nAg (20% Ag) sobre placas de la aleación de titanio Ti-6Al-4V, se procedió a recubrir pilares de cicatrización de implantes dentales, con el objeto de realizar finalmente estudios *in vivo*. Estos pilares fueron suministrados por PHIBO (modelo ProUnic) con las

siguientes dimensiones: 5mm de diámetro externo y 2mm de diámetro interno. En la figura 6.21 se muestran las diferentes partes de un implante dental, indicando cuál es el pilar de cicatrización estudiado.

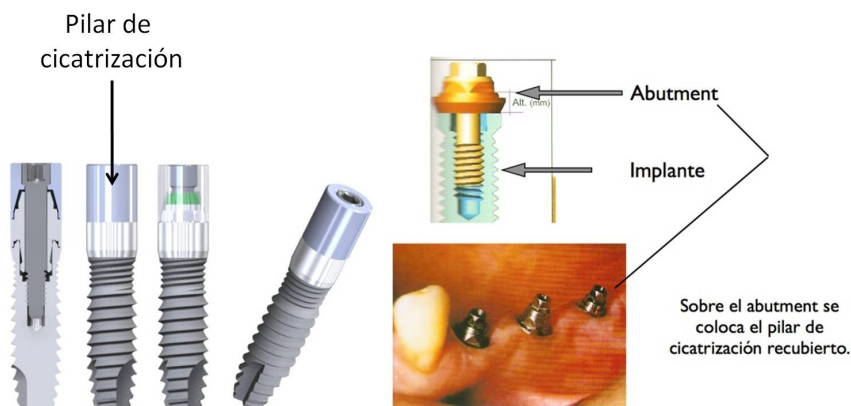


Figura 6.21: Esquema de un implante dental.

Los pilares de cicatrización de la aleación de titanio fueron recubiertos usando la técnica de inmersión (*dipping*) debido a que al tener una geometría cilíndrica no pueden ser recubiertos de forma uniforme mediante la técnica de sedimentación. La técnica de inmersión consiste en sumergir la pieza a recubrir, en este caso el pilar de cicatrización, en una suspensión que contenga el material con el que se quiere realizar el recubrimiento. En este procedimiento de inmersión son críticas las velocidades de entrada y salida de la pieza en la suspensión, así como el porcentaje en sólidos de dicha suspensión. En este caso se utilizó como vehículo líquido el pentanol (Fluka-1-Penatanol, número de producto 79630, 98,0% de pureza de grado cromatografía de gases). Tras una serie de ensayos, las condiciones óptimas encontradas fueron las siguientes:

- La suspensión del vidrio-nAg empleada contiene un 70 % en sólidos
- Temperatura ambiente: $\sim 20^{\circ}\text{C}$
- Humedad relativa: $\sim 30\%$
- Velocidad de inmersión: 500mm/min
- Tiempo de inmersión: 3 segundos
- Velocidad de salida: 500mm/min
- Temperatura secado: 20°C
- Tiempo de secado: 24h

El equipo empleado fue un equipo de *dip-coating* con control del motor para el brazo de inmersión, que proporciona un movimiento lineal liso del sustrato en un rango de velocidades de inmersión, que van de 0,5mm/min hasta 500mm/min.

Finalmente, los pilares recubiertos mediante inmersión fueron sinterizados en atmósfera de argón durante 1h a 980°C . En las figuras 6.22A, B y C aparecen las imágenes del pilar comercial sin tratar, el pilar recubierto en verde y el pilar sinterizado, respectivamente.

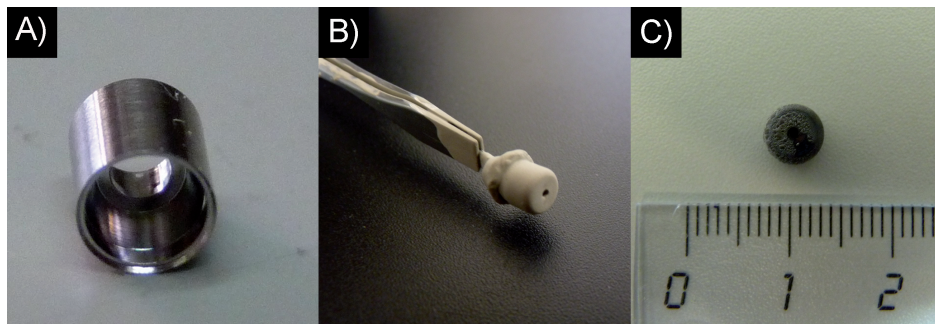


Figura 6.22: Imágenes del pilar de cicatrización: sin recubrir (A), recubierto con vidrio-nAg en verde (B) y recubierto con vidrio-nAg sinterizado a 980°C (C).

6.4.1. Caracterización de los recubrimientos sobre pilares de cicatrización de la aleación de Ti-6Al-4V

Los pilares de cicatrización recubiertos fueron caracterizados de la misma manera que se hizo con las placas de titanio recubiertas estudiadas en el apartado anterior 6.2, obteniéndose resultados similares.

También se determinó la dureza Vickers en los pilares, ya que al poseer una geometría cilíndrica pueden generarse tensiones residuales en las zonas de curvatura. Tras la realización de estos ensayos se pudo comprobar que la dureza Vickers es similar a la de las placas de titanio en todas las partes del pilar, siendo el valor medio obtenido de $330 \pm 8 \text{ kg/mm}^2$ (el valor medio para la placa de titanio fue de $328 \pm 8 \text{ kg/mm}^2$).

En la figura 6.23 se muestran las marcas de indentación realizadas sobre la sección transversal pulida de un pilar de cicatrización. Como puede deducirse de la figura 6.23B, la adherencia del recubrimiento al sustrato es muy buena, ya que la grieta provocada mediante indentación en la interfase no se propaga a través de ella.

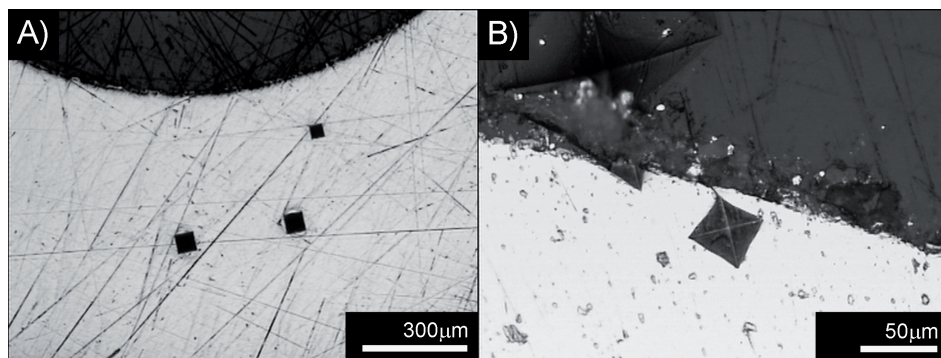


Figura 6.23: Imágenes de microscopía óptica mostrando las marcas de indentación con 0,5kg sobre la sección transversal de: la parte central del pilar (A) y la zona colindante con la interfase (B).

6.4.2. Actividad biocida de los recubrimientos sobre pilares de cicatrización de Ti-6Al-4V

La actividad biocida de los pilares recubiertos fue evaluada frente a *Escherichia coli* JM110, *Micrococcus luteus* y la levadura *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, siguiendo el procedimiento de F. Malpartida para el conteo de viables mediante antibiogramas, descrito en el capítulo de materiales y métodos. Los resultados de la reducción logarítmica en el número de viables para *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* fueron >5 en todos los casos, lo que significa una desinfección segura según la EPA.¹⁰

La actividad biocida de estos pilares de cicatrización recubiertos fue evaluada *in vivo* en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión (CCMI) Jesús Usón situado en Cáceres. Para este estudio se emplearon 5 perros *Beagle* a los cuales les fueron implantados 5 pilares de cicatrización a cada uno. Tres de estos pilares estaban recubiertos por vidrio-nAg y los otros dos se implantaron sin recubrir, con el objeto de que sirvieran como control. El número de perros estudiados y la cantidad de implantes por

perro fueron seleccionados para que los resultados fueran estadísticamente significativos.

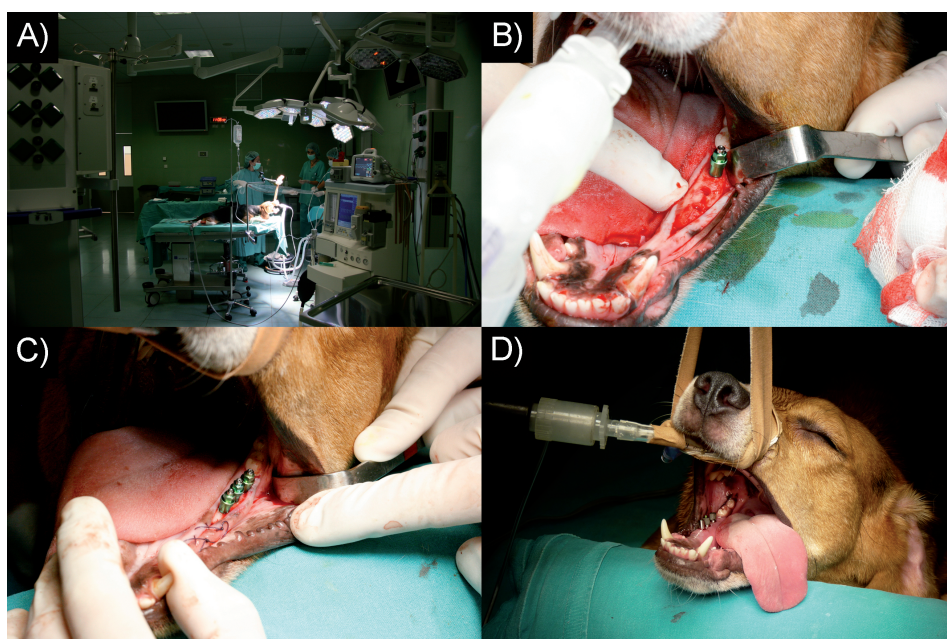


Figura 6.24: Imágenes de la implantación de los pilares de cicatrización en un perro *Beagle*. Fotografía general del quirófano (A), detalles de la implantación de los pilares de cicatrización (B y C) y pilares de cicatrización ya implantados (D).

El estudio consistió en lo siguiente: en primer lugar se realizaron las extracciones de las muelas correspondientes, tras 20 semanas de cicatrización se implantaron los pilares transgingivales. En la semana 24 (al mes), se sustituyeron por los pilares de cicatrización recubiertos con el vidrio-nAg. Durante las 8 semanas siguientes los perros fueron alimentados normalmente y se les cepillaron los dientes. Tras este periodo, y durante otras 8 semanas, se les indujo periodontitis poniendo ligaduras de algodón para fomentar la formación de placa bacteriana y se eliminó el

cepillado de dientes. Finalmente, se retiraron las ligaduras y se realizó un estudio de Rayos X para ver la evolución de los implantes y la posible pérdida de hueso.

En la figura 6.24 se muestra el proceso de implantación de los tres pilares de cicatrización en un perro *Beagle*. En todos los experimentos con los perros se han seguido los protocolos que rigen las normativas de la Unión Europea y se han obtenido los permisos de los correspondientes comités de ética.

Estos estudios están en proceso de desarrollo actualmente bajo la dirección de un equipo de odontólogos. Al final de este estudio, que se estima durará unos 2 años, se podrá evaluar de forma cuantitativa la influencia que tiene el recubrimiento para evitar el grave problema de la periimplantitis.

6.5. Bibliografía

1. A. D. Pye, et al. A review of dental implants and infection. *J. Hosp. Infect.* 2009;72(2):104-110.
2. M. Geetha, et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. A review. *Prog. Mater. Sci.* 2009;54(3):397-425.
3. M. Niinomi. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2008;1(1):30-42.
4. P. A. Evans, R. Stevens, J. G. P. Binner. Quantitative X-ray Diffraction Analysis of Polymorphic Mixes of Pure Zirconia. *Br Ceram. Trans.* 1984;83:39-43.
5. . A. P. Tomsia, J. A. Pask. Chemical reactions and adherence at glass/metal interfaces: an analysis. *Dent. Mater.* 1986;2(1):10-16.
6. E. Saiz, R. M. Cannon, A. P. Tomsia. High-temperature Wetting and the Work of Adhesion in Metal/Oxide Systems. *Ann. Rev. Mater. Res.* 2008;38:197-226.
7. R. M. German. *Sintering Theory and Practice*. New York: John Wiley & Sons, 1996.
8. J. L. Murray, K. J. Bhansali. The Ag-Ti (Silver-Titanium) system. *Bulletin of alloy phase diagrams* 1983;4(2):178-183.
9. M. R. Rijnders, et al. Solid state reactions in the Ag-Ti-Si system - Periodic layer formation. *Zeitschrift für Metallkunde* 1996;87(9):732-739.
10. U. S. E. P. A. (EPA). National Primary Drinking Water Regulations. [Disponible en: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>]

11. A. Panacek, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida spp.* Biomaterials 2009;30(31):6333-6340.
12. Teughels W, et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. Clin. Oral Implants. Res. 2006;17:68-81.
13. Bürgers R, et al. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. Clin. Oral Implants. Res. 2010;21:156-164.

Capítulo 7

Conclusiones

Del presente trabajo de tesis se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. Se han obtenido vidrios sodocálcicos con nanopartículas de cobre o plata ($<20\text{nm}$) monodispersas en la matriz vítrea a partir de sepiolita-nAg, sepiolita-nCu y vitelinato-nAg.
2. Los polvos de vidrio obtenidos ($<32\mu\text{m}$), que contienen nanopartículas de cobre o plata metálicas, poseen una elevada actividad biocida frente a bacterias gram-negativas, gram-positivas y frente a levaduras (reducción logarítmica de las unidades formadoras de colonias >4).
3. Se ha puesto de manifiesto un efecto sinérgico entre las nanopartículas de plata o cobre y el Ca^{2+} lixiviado de la matriz vítrea, el cual potencia notablemente la actividad biocida de las nanopartículas de plata o cobre.
4. Se ha verificado que la incorporación de nanopartículas de plata o de cobre al vidrio sodocálcico incrementa su tenacidad, mejorándose las propiedades mecánicas del vidrio de partida. Por ejemplo, $\Delta K_{IC} \sim 0,64\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ para un vidrio n-Ag con un contenido de nAg de 20%.

5. Se han obtenido recubrimientos estables química y mecánicamente sobre materiales cerámicos (alúmina, circona y vidrio) a partir de los polvos de vidrio-nAg y vidrio-nCu con actividad biocida frente a bacterias gram-negativas, gram-positivas y levaduras (reducción logarítmica de las unidades formadoras de colonias >3).
6. Se han obtenido recubrimientos mecánicamente estables a 980°C en atmósfera de argón sobre aleaciones de Ti-6Al-4V a partir de polvo de un vidrio-nAg con una actividad biocida elevada frente a bacterias gram-negativas, gram-positivas y levaduras (reducción logarítmica de las unidades formadoras de colonias >4).
7. Se ha puesto de manifiesto que una fracción de las nanopartículas de plata que contiene el recubrimiento se alea con el sustrato de titanio a la temperatura de elaboración del recubrimiento (980°C), incrementándose tanto la mojabilidad del vidrio como la adherencia al sustrato.
8. En el caso de los vidrios que contienen cobre (vidrio-nCu y vidrio-Cu_{incorporado}) se ha comprobado que los vidrios con nanopartículas de cobre metálicas poseen una mayor actividad biocida (reducción logarítmica de las unidades formadoras de colonias >3), que la correspondiente a los vidrios con Cu^{2+} (reducción logarítmica $\sim 1-3$). Además, se han podido obtener micrografías de las nanopartículas de cobre adheridas, en una primera etapa a la superficie de la membrana de los microorganismos (por ejemplo *Escherichia coli*), y en una segunda etapa se pudo comprobar que penetraron en el interior de la célula. Hasta la presente tesis las nanopartículas de cobre no han podido ser observadas mediante microscopía electrónica, debido a su inestabilidad y tendencia a la oxidación. En este trabajo, al estar protegidas por la matriz vítrea y ser lixiviadas lentamente, han podido ser observadas como Cu^0 mediante microscopía electrónica de transmisión.

9. Se ha puesto de manifiesto que, en las condiciones en las que se han realizado los estudios de actividad biocida, las nanopartículas de plata han resultado ser notablemente más activas que las de cobre.
10. Se han implantado con éxito en perros *Beagle* prótesis dentales (pilares de cicatrización de Ti-6Al-4V) recubiertas con vidrio-nAg, con probada actividad biocida y obteniéndose resultados preliminares muy prometedores.

Publicaciones derivadas de la tesis

Artículos:

1. C Pecharromán, A Esteban-Cubillo, H Fernández, L Esteban-Tejeda et al. Synthesis, conforming, linear and non-linear optical properties of Gold nanoparticles-sepiolite compacts. *Plasmonics* 2009;4:261-266.
2. L Esteban-Tejeda. The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2009;20(8):art. n° 085103.
3. L Esteban-Tejeda. The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing copper nanoparticles. *Nanotechnology* 2009;20(50):art n° 505701.
4. L Esteban-Tejeda, F Malpartida, C Pecharroman, JS Moya. High Antibacterial and Antifungal Activity of Silver Monodispersed Nanoparticles Embedded in a Glassy Matrix. *Adv. Eng. Mater.* 2010;12(7):B292-B297.
5. M Miranda, A Fernández, M Díaz, L Esteban-Tejeda et al. Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericidal and fungicidal materials. *Int. J. Mater. Res.* 2010;101(1):122-127.

6. . M Suárez, L Esteban-Tejeda, F Malpartida, A Fernández et al. Biocide activity of diatom-silver nanocomposite. Mater. Lett. 2010;64(19):2122-2125.
7. JS Moya, L Esteban-Tejeda, C Pecharromán, S Mello-Castanho et al. Glass-powders with a high content of calcium oxide: a step toward a "green" universal biocide. Advanced biomaterials 2011;64:256-260.
8. L Esteban-Tejeda, F Malpartida, LA Díaz, R Torrecillas et al. Glass-(nAg, nCu) biocide coatings on ceramic oxide substrates. PLoS ONE 2012;7: doi: 10. 1371/journal.pone/0033135.
9. L Esteban-Tejeda, B Cabal, F Malpartida, R López-Piriz et al. Soda-Lime Glass coating containing silver nanoparticles on Ti-6Al-4V alloy. J. Eur. Ceram. Soc. 2012. In Press.
10. B Cabal, F Cafini, L Esteban-Tejeda, L Alou et al. Inhibitory effect on in vitro *Streptococcus oralis* biofilm of a soda-lime glass containing silver nanoparticles coating on titanium alloy. PLoS ONE 2012. In Press.

Patentes:

1. JS Moya, M Díaz, M F Barba, F Malpartida, M Miranda, A Fernández, L Esteban-Tejeda, S López-Esteban y R Torrecillas. Polvo compuesto nanoestructurado fosfato de calcio plata. Procedimiento de obtención y sus aplicaciones biocidas y fungicidas. n° solicitud 200803695.
2. JS Moya, L Esteban- Tejeda, C Pecharromán y Francisco Malpartida Romero. Polvo de composición vítrea con actividad biocida. n° solicitud ES1641.668.

Apéndice A

Actividad biocida de vidrios con alto contenido en calcio

Los vidrios sodocálcicos han sido ampliamente utilizados en numerosas aplicaciones, tales como en la fabricación de envases, en la construcción de edificios o en las industrias farmacéutica y alimentaria. Sin embargo, es bien sabido que estos vidrios no poseen actividad biocida alguna, lo cual ha motivado el desarrollo de esta tesis, incorporándoles nanopartículas de plata o de cobre para convertirlos en materiales con una elevada actividad biocida.

Como consecuencia de los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación, tal es el caso del efecto sinérgico del Ca^{2+} , se sinterizaron y estudiaron polvos de vidrios sodocálcicos con contenidos crecientes en óxido de calcio, para determinar su efecto sobre la actividad biocida de los mismos.

Para ello, se fabricaron vidrios pertenecientes al sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-B}_2\text{O}_3$. La formulación de estos vidrios se diseñó de acuerdo con el diagrama de equilibrio $\text{CaO-Na}_2\text{O-SiO}_2$ y teniendo en cuenta que la temperatura de fusión debía estar comprendida entre

1200-1300°C. Con este fin, se tuvo en cuenta el diagrama de equilibrio $\text{SiO}_2\text{-CaO-B}_2\text{O}_3$, de manera que parte del contenido del óxido formador SiO_2 fue reemplazado por B_2O_3 , también óxido formador, con el objeto de disminuir la viscosidad del vidrio obtenido y poder alcanzar la fusión en el margen señalado de temperatura. Con propósito comparativo también fue estudiado un vidrio de fosfato con elevado contenido en CaO , cuya actividad antimicrobiana es bien conocida.¹⁻⁴

A.1. Caracterización de polvos de vidrio con alto contenido en calcio

Las distribuciones de tamaño de partícula correspondientes a los vidrios G-1, G-2, G-3 y G-4 se representan en la figura A.1, siendo los d_{50} : $2,9\pm 0,4$; $8,5\pm 0,8$; $5\pm 0,9$ y $9,5\pm 0,9$, respectivamente.

Los polvos de vidrio obtenidos fueron caracterizados mediante análisis químico, estudio de la superficie específica, estudio de la resistencia hidrolítica, espectroscopía infrarroja de absorción de transformada de Fourier, análisis del calcio lixiviado al medio de cultivo durante los ensayos de actividad biocida, medidas del pH de las suspensiones acuosas de los distintos polvos de vidrio y análisis del tamaño de partícula.

Los análisis químicos y las superficies específicas de los diferentes polvos de vidrio denominados como G-1, G-2, G-3 y G-4 se recogen en la tabla A.1.

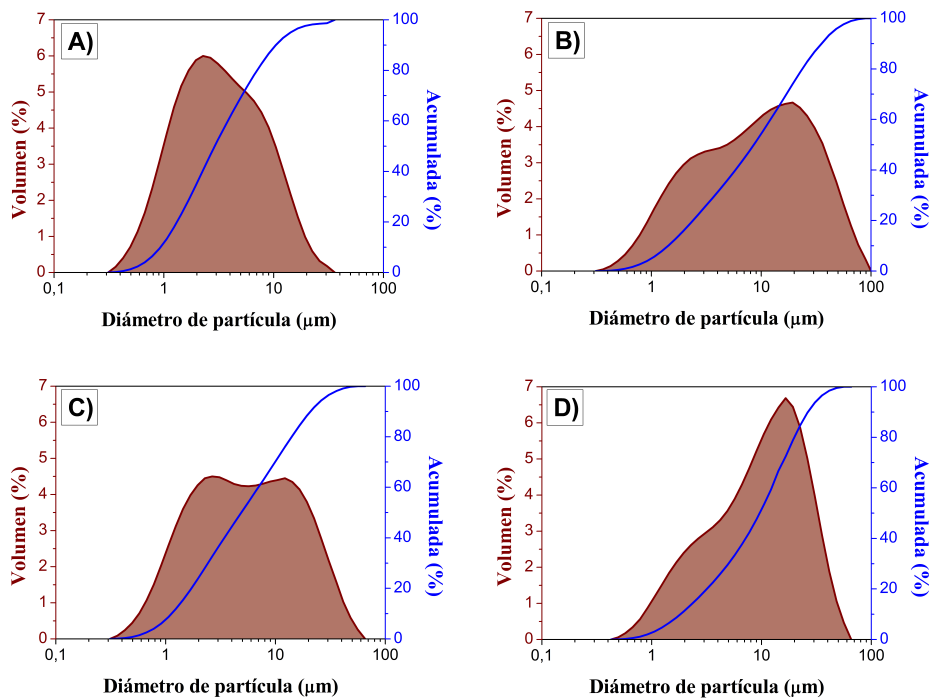


Figura A.1: Distribución de tamaño de partícula para los vidrios: G-1 (A), G-2 (B), G-3 (C) y G-4 (D).

	Composición química (%peso)										Sup. esp. (m ² /g)
	SiO ₂	B ₂ O ₃	Na ₂ O	CaO	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Otros	
G-1	70,2	1,06	15,8	7,1	-	0,05	3,2	1,71	0,02	0,86	1,3±0,2
G-2	44,3	7,4	23,7	15,0	-	0,82	-	8,17	0,12	0,49	1,6±0,2
G-3	40,3	8,5	18,8	19,2	-	0,57	-	11,7	0,12	0,81	1,8±0,2
G-4	46,2	-	22,6	24,2	6,21	-	-	-	-	0,79	1,6±0,2

Tabla A.1: Composición química (%peso) y superficie específica de los polvos de vidrio.

También fue evaluada la resistencia hidrolítica de los distintos polvos de vidrio, es decir, la pérdida de masa de los vidrios durante el ataque hidrolítico (figura A.2A), donde se observa que las tasas de disolución para los polvos de vidrio G-3 y G-4 son ligeramente superiores a la correspondiente al G-1 (el vidrio sodocálcico estudiado durante esta tesis). En cambio, el polvo de vidrio G-2 es notablemente más soluble en agua que el resto, probablemente debido a su mayor relación alcalinos/sílice.

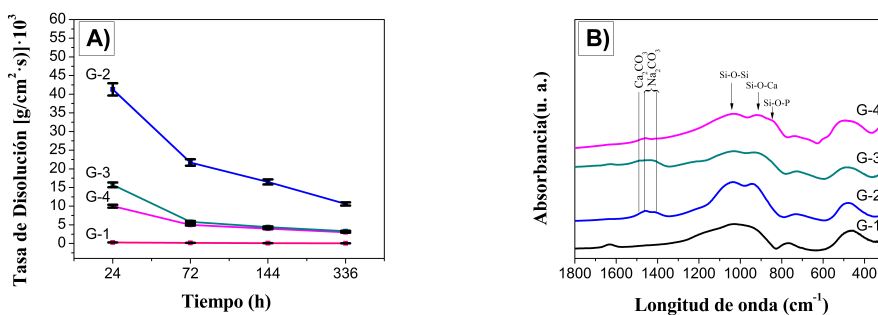


Figura A.2: Caracterización físico-química de los vidrios. Tasa de disolución en agua destilada (A) y espectros de absorción infrarrojos (B).

Por otra parte, se estudiaron los espectros de absorción obtenidos a partir de espectrometría infrarroja de transformada de Fourier mostrados en la figura A.2B. Esta técnica es muy sensible a trazas de carbonatos que son liberados por las partículas de vidrio. De hecho, aparecen bandas de absorción a 1413 y 1460 cm^{-1} , que se corresponden con carbonatos sódicos, y una banda de absorción a 485 cm^{-1} debida a la presencia de aragonita (carbonato cálcico). A su vez, el desdoblamiento del modo de vibración de alargamiento del Si-O-Si en los vidrios G-2 y G-3 revela el efecto modificador en la red vítrea del Ca^{2+} . También, el Ca^{2+} modifica el modo de vibración del P^{5+} en el G-4. El Ca^{2+} rompe la red vítrea, facilitando la lixiviación de los iones Na^+ y Ca^{2+} , por lo que parece ser el principal agente responsable de la actividad biocida de los vidrios. En un futuro se tendrá que llevar a cabo un estudio cinético y estructural de la lixiviación del Ca^{2+} , y la influencia que ejerce

la estructura del vidrio de partida, para lograr un completo entendimiento de este proceso.

A.2. Actividad biocida de vidrios con alto contenido en calcio

La actividad biocida de estos vidrios fue evaluada siguiendo el método de cultivo en medio líquido descrito en el apartado 2.18 del capítulo 2 y frente a los microorganismos empleados durante esta tesis: *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis*. Los ensayos se realizaron por triplicado. En la figura A.3 se representan las reducciones logarítmicas tras 24 y 48h de ensayo biocida para los vidrios estudiados. De esta figura se deduce que todos los vidrios con un contenido de $\text{CaO} \geq 15$ %peso, tras 48h, alcanzan una reducción logarítmica >4 , lo que significa una desinfección segura, según la regulación de agua potable primaria nacional de la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA),⁵ ya comentada anteriormente. Los resultados obtenidos tras 24h son similares, excepto para *M. luteus*, en cuyo caso particular la reducción logarítmica obtenida fue un 30-50% menor que la correspondiente a 48h.

Tras la finalización del periodo de crecimiento, los microorganismos y las partículas en suspensión fueron retirados del medio mediante centrifugación y filtración y el Ca^{2+} lixiviado fue determinado por ICP (figura A.4A). También se realizaron medidas de pH (figura A.4B), tras mantener 5 minutos las suspensiones acuosas de los vidrios (10gL^{-1}), bajo fuerza iónica constante (KNO_3 10^{-2}M).

En la figura A.4A se observa una clara correlación entre el Ca^{2+} lixiviado y el contenido en CaO de los vidrios. La cantidad lixiviada de Ca^{2+} está muy por debajo de los valores considerados tóxicos para las células, de manera que este no es el motivo de la elevada actividad biocida de los vidrios con un alto contenido de calcio.

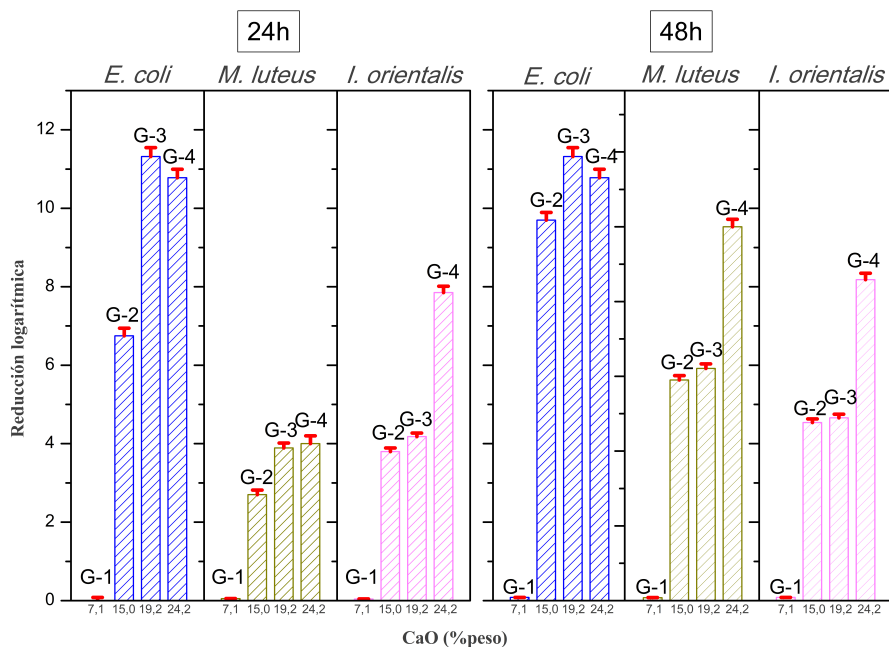


Figura A.3: Reducción logarítmica en cultivos de *E. coli*, *M. luteus* e *I. orientalis* tras 24 y 48h para los vidrios G-1, G-2, G-3 y G-4.

Como se muestra en la figura A.4B, las suspensiones acuosas de los vidrios incrementan drásticamente el pH, seguramente por la liberación de iones Ca^{2+} por parte de los vidrios. Sin embargo, los valores de pH de los medios de cultivo también fueron medidos, siendo en todos los casos $\sim 7,5$ y siempre inferior a 8. Esto se debe al efecto tampón de los nutrientes añadidos al medio. Estas observaciones conducen a pensar que posiblemente la interfase vidrio-membrana sea crucial para la actividad biocida de los vidrios. En este pequeño espacio el pH es muy bajo (< 2) debido a la bomba de protones de las células,⁶ lo cual puede propiciar la lixiviación del Ca^{2+} , incrementándose notablemente su concentración justo en la interfase vidrio-membrana. El ión Ca^{2+} alcaliniza fuertemente

las inmediaciones de la membrana, induciendo una rápida despolarización^{7,8} y/o una introducción masiva de calcio en el citoplasma, dando lugar a una alcalinización interna que, probablemente, bloquea el proceso de restauración del gradiente electroquímico, lo que finalmente conduce a la muerte de la célula.

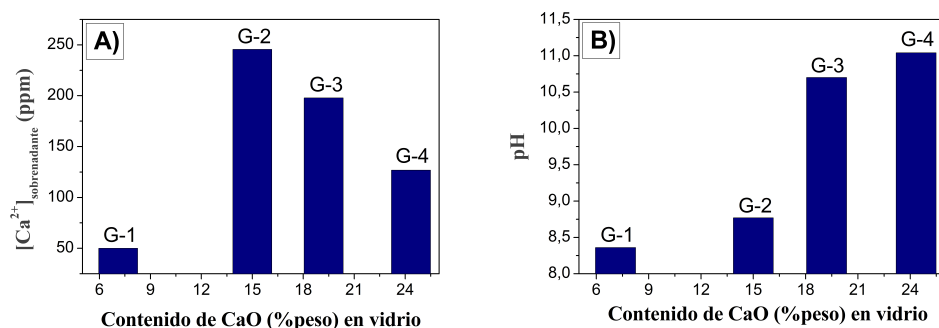


Figura A.4: Fracción de Ca^{2+} en los sobrenadantes de los cultivos tras 48h de ensayo biocida (A) y valores de pH para los vidrios en suspensión acuosa frente a la cantidad de CaO contenida en los vidrios (B).

El gradiente electroquímico a través de la membrana en las bacterias y levaduras es un proceso universal que se ha representado esquemáticamente en la figura A.5. Este gradiente está muy relacionado con la síntesis de ATP, con la toma de nutrientes y el mantenimiento de importantes procesos celulares. En teoría se considera una diana excelente para los agentes antimicrobianos. En las levaduras, la clave para mantener el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática es la H^+ -ATPasa.⁹

La actividad genera un gradiente electrogénico de protones variando entre -150 y -90mV y un pH muy bajo,⁶ el cual también es el responsable de mantener el balance de iones en las bacterias y levaduras (principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}). En *Saccharomyces cerevisiae* este sistema bioenergético ha sido bien caracterizado. El sistema de intercambio

cationes/ H^+ juega un papel importante en el mantenimiento del intercambio de nutrientes y en el balance de iones, tales como Na^+ y (Ca^{2+}).^{7,10,11} Bajo estas consideraciones, se puede conjeturar que la presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} en las proximidades de la membrana plasmática (como se ha sugerido anteriormente) distorsiona el gradiente de potencial electroquímico, explicando la actividad biocida observada.^{8,10}

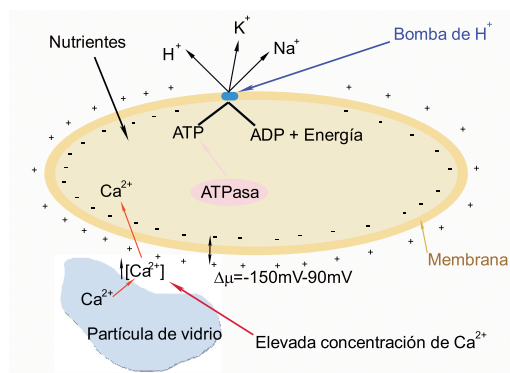


Figura A.5: Representación esquemática de la despolarización de membrana.

Para comprender mejor el mecanismo de la actividad biocida de los vidrios, se realizaron microscopías electrónicas de transmisión de los cultivos de los microorganismos expuestos 1h a la acción de los vidrios. En la figura A.6 (superior) se muestran varios ejemplos de las micrografías tomadas, donde puede observarse cómo las partículas de vidrio interaccionan con los microorganismos, probablemente por las fuerzas electrostáticas entre las partículas de vidrio negativamente cargadas (sus puntos isoelectrónicos están localizados aproximadamente a $pH=2$)¹²⁻¹⁴ y la superficie de las membranas celulares, que está positivamente cargada.^{6,15} Esta carga positiva se debe a que, durante el periodo de crecimiento de los microorganismos, existe un fuerte eflujo de protones y/o otros iones (H^+ ,

Na^+ , K^+). Es justo en este periodo, cuando tiene lugar la interacción entre las partículas de vidrio y la membrana. En una segunda etapa, se produce la lixiviación del calcio de la superficie de las partículas de vidrio justo en la interfase vidrio-membrana (como ya se había postulado inicialmente).

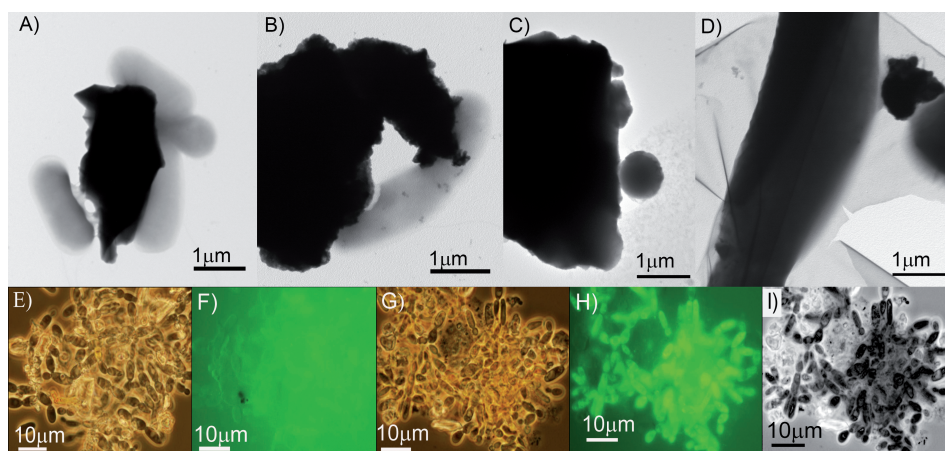


Figura A.6: Actividad biocida de las partículas de vidrio frente a los cultivos de microorganismos. Imágenes superiores: micrografías electrónicas de transmisión tras 1h de ensayo biocida mostrando un cultivo de *E. coli* suplementado con vidrio G-3 (A) o con G-4 (B); un cultivo de *M. luteus* suplementado con G-3 (C) y un cultivo de *I. orientalis* con G-3 (D). Imágenes inferiores: Micrografías ópticas de un cultivo de *I. orientalis* tras 1h de ensayo biocida con: G-1 bajo luz visible (E) y bajo condiciones de fluorescencia (F); con G-3 bajo luz visible (G), bajo condiciones de fluorescencia (H) y la superposición de las imágenes G-H (I), donde las células en negro corresponden a las células muertas.

Con el mismo propósito de comprender mejor la actividad biocida observada en los distintos vidrios, la despolarización de membrana (hipótesis de partida) fue analizada en cultivos jóvenes de medio líquido de *E. coli* JM110, *M. luteus* e *I. orientalis* expuestos a las diferentes

muestras. Como aparece en la figura A.6 (parte inferior), se produce una rápida despolarización de membrana (indicada por el incremento en la fluorescencia) en el caso de *I. orientalis* tratada con G-3. Sin embargo, no se observa en el cultivo tratado con el vidrio G-1 (que, como se ha visto anteriormente, no tenía actividad biocida). La rápida acción del vidrio G-3 (aproximadamente el 80% de las células están muertas tras 1h) se muestra en la micrografía superpuesta (I) de la figura A.6. Resultados similares se obtuvieron al tratar los cultivos con CCCP (carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona) o con gramicidina A, conocidos agentes desacopladores o disipadores de potenciales eléctricos en células vivas. Estos resultados sugieren fuertemente que se ha producido una destrucción del potencial eléctrico en las membranas celulares, anulando la fuerza protón-motriz. Todo ello señala ese elemento celular como la diana principal para las partículas de vidrio ricas en calcio. Resultados similares se obtuvieron con *E. coli* y *M. luteus*, así como con el vidrio G-4.

También se evaluó el efecto del tamaño de partícula de los vidrios, repitiendo los experimentos con un tamaño de partícula $<32\mu\text{m}$, obteniéndose los mismos resultados. La inesperada actividad biocida de estos vidrios los convierte en materiales muy prometedores, como alternativa a los agresivos biocidas orgánicos comerciales, por ejemplo, Triclosan.^{16–18} Una ventaja de estos vidrios yace en que son estables frente a los agentes medioambientales. Además, están compuestos por SiO_2 , Na_2O , CaO , Al_2O_3 y B_2O_3 , que son materiales constituyentes del suelo, y, por lo tanto, son compatibles con el medio ambiente. Otra ventaja es que su actividad biocida se basa en la interacción directa con las células de los microorganismos.

A.3. Bibliografía

1. I. Allan. Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials* 2001;22(12):1683-1687.
2. S. Hu, et al. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass. *J. Mater. Sci. Med.* 2009;20(1):281-286.
3. T. Waltimo. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *J. Dent. Res.* 2007;86(8):754-757.
4. M. Zehnder, et al. Dentin enhances the effectiveness of bioactive glass S53P4 against a strain of *Enterococcus faecalis*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics* 2006;101(4):530-535.
5. U. S. E. P. A. (EPA). National Primary Drinking Water Regulations. [Disponible en: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>]
6. P. de la Peña, et al. The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. The role of potassium. *Eur. J. Biochem.* 1982;123(2):447-453.
7. X. Cai, J. Lytton. The cation/ Ca^{2+} exchanger superfamily: Phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Biol. Evol.* 2004;21(9):1692-1703.
8. J. K. Pittman, et al. A cation-regulated and proton gradient-dependent cation transporter from *Chlamydomonas reinhardtii* has a role in calcium and sodium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2009;284(1):525-533.
9. F. Malpartida, R. Serrano. Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 1981;256(9):4175-4177.

10. . J. M. Pardo, et al. Alkali cation exchangers: Roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 2006;57(5):1181-1199.
11. T. Shigaki, et al. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *J. Mol. Evol.* 2006;63(6):815-825.
12. H. Fadel, et al. Polyelectrolyte adsorption onto planar surfaces: A study by electrokinetic measurements. *Angew. Makromol. Chem.* 1998;263(1):79-84.
13. H. Kudo, M. Fujihira. DNA-Templated copper nanowire fabrication by a two-step process involving electroless metallization. *IEEE Transac Nanotech* 2006;5(2):90-92.
14. P. Somasundaran, et al. Cohesive force apparatus for interactions between particles in surfactant and polymer solutions. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2005;266(1-3):32-37.
15. A. Goffeau, et al. The H⁺-ATPase of the yeast plasma membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982;402:91-98.
16. M. Allmyr, et al. Human exposure to triclosan via toothpaste does not change CYP3A4 activity or plasma concentrations of thyroid hormones. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2009;105(5):339-344.
17. . T. Geens, et al. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 2009;76(6):755-760.
18. A. E. Greyshock, P. J. Vikesland. Triclosan reactivity in chloraminated waters. *Environ. Sci. Technol.* 2006;40(8):2615-2622.